

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

**Luiza Pieta**

**ANÁLISE TRANSCRICIONAL DE GENES RELACIONADOS À FORMAÇÃO DE  
BIOFILME E VIRULÊNCIA EM CEPAS DE *Listeria monocytogenes* CULTIVADAS  
EM DIFERENTES TEMPERATURAS**

Porto Alegre  
Fevereiro de 2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

**Luiza Pieta**

**ANÁLISE TRANSCRICIONAL DE GENES RELACIONADOS À FORMAÇÃO DE  
BIOFILME E VIRULÊNCIA EM CEPAS DE *Listeria monocytogenes* CULTIVADAS  
EM DIFERENTES TEMPERATURAS**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos como um dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientador: Jeverson Frazzon

Co-orientadora: Roberta Cruz da Silveira Thys

Porto Alegre

Fevereiro de 2013

### CIP - Catalogação na Publicação

Pieta, Luiza

Análise transcricional de genes relacionados à formação de biofilme e virulência em cepas de *Listeria monocytogenes* cultivadas em diferentes temperaturas / Luiza Pieta. -- 2013.  
61 f.

Orientador: Jeverson Frazzon.

Coorientadora: Roberta Cruz da Silveira Thys.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Porto Alegre, BR-RS, 2013.

1. *Listeria monocytogenes*. 2. formação de biofilme. 3. virulência. 4. RT-qPCR. I. Frazzon, Jeverson, orient. II. Cruz da Silveira Thys, Roberta, coorient. III. Título.

**Luiza Pieta**

Engenheira de Alimentos – UFRGS

**DISSERTAÇÃO**

Submetida como parte dos requisitos para obtenção do grau de

**MESTRE EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS**

Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos (PPGCTA)

Universidade Federal do Rio Grande do Sul – Porto Alegre, RS, Brasil.

Aprovada em:

Pela Banca Examinadora:

Homologado em:

Por:

**JEVERSON FRAZZON**

Orientador – PPGCTA/UFRGS

**EDUARDO CESAR TONDO**

Banca – PPGCTA/UFRGS

**ANA PAULA GUEDES FRAZZON**

Banca – PPGMAA/UFRGS

**LUIA ABRUZZI DE OLIVEIRA**

Banca – Post-Doc do PPGBM/UFRGS

**MARCO ANTÔNIO ZÁCHIA AYUB**

Coordenador do Programa de Pós-

Graduação em Ciência e Tecnologia

de Alimentos (PPGCTA/UFRGS)

**VITOR MANFROI**

Diretor do Instituto de Ciência

e Tecnologia de Alimentos

(ICTA/UFRGS)

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço aos meus pais, Hermes e Vera Lia, e ao meu irmão Enrico, por todo o apoio e carinho não só durante o período de realização deste mestrado, mas em tudo na minha vida. Um agradecimento especial a minha mãe, que sempre esteve ao meu lado tanto nos momentos de alegria quanto nos de decepção, me aconselhando, me criticando, mas acima de tudo, dando força e me encorajando a ir atrás de tudo aquilo que almejo. Mamis, tu és única!!!

Ao meu orientador Jeverson Frazzon, por todos os ensinamentos, conversas e discussões, que não se restringiam somente a assuntos relacionados ao trabalho, e a minha co-orientadora Roberta Cruz da Silveira Thys, pelo auxílio em importantes etapas deste estudo.

A toda a “tigrada” dos laboratórios 208 e 205, colegas de mestrado, doutorado, professores e alunos de IC, obrigada por toda a ajuda científica, e também pelas boas risadas e almoços memoráveis no RU. Agradeço principalmente a Flávia e a Mari, que me auxiliaram na realização dos experimentos, como bolsistas de pesquisa do laboratório.

A todos os laboratórios que me disponibilizaram sua estrutura e materiais, principalmente ao LBMV (CBiot) e ao Laboratório de Microbiologia Molecular (UFCSPA), onde fiz uso de equipamentos fundamentais para a realização de parte dos meus experimentos. A Dra. Luisa Abruzzi de Oliveira e ao Dr. Gustavo Pelicoli Riboldi, o meu sincero agradecimento por toda a paciência ao esclarecerem as minhas inúmeras dúvidas.

A UFRGS, em especial ao ICTA e seu Programa de Pós-Graduação (PPGCTA), pelo espaço físico e pela oportunidade de realização deste projeto. A CAPES, agradeço o apoio financeiro durante os 24 meses de trabalho.

A todos os meus amigos e amigas, que foram fundamentais para que eu conseguisse finalizar mais essa etapa, e com um humor muito melhor!! Um “upa” especial a Thayse, Cristina e Aline. Valeu pela parceria, chicas!

Ao Eduardo, que teve uma participação bastante ativa na reta final desse trabalho, agradeço por toda a atenção e compreensão, e também pela ajuda com as muitas tabelas de Excel e na análise dos resultados.

A todos que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho, MUITO OBRIGADA!

# **Análise transcricional de genes relacionados à formação de biofilme e virulência em cepas de *Listeria monocytogenes* cultivadas em diferentes temperaturas**

Autor: Luiza Pieta

Orientador: Jeverson Frazzon

## **RESUMO**

Dentre as oito espécies do gênero *Listeria*, a única transmitida por alimentos, patogênica para humanos, é a *Listeria monocytogenes*. De grande preocupação para a indústria alimentícia, este microrganismo pode ser encontrado em diversas superfícies de plantas processadoras de alimentos, sendo capaz de se aderir e formar persistentes biofilmes. No presente trabalho, foi estudada a influência da concentração de glicose e do tempo de incubação na formação de biofilme por uma cepa de *L. monocytogenes*, sorotipo 1/2a, cultivada em três diferentes temperaturas, 7°C, 25°C e 37°C, através de planejamento experimental utilizando a Metodologia de Superfície de Resposta. As duas variáveis testadas, para os intervalos estudados, foram significativas ( $p < 0,05$ ) na formação de biofilme somente na temperatura de 37°C e, tanto concentrações de glicose tendendo a zero combinadas com tempos de incubação próximos a 26 h, como maiores concentrações de glicose combinadas com menores tempos de incubação, dentro da faixa de estudo aplicada, representaram boas condições para a formação de biofilme. Foi também realizada a análise transcricional de genes relacionados à formação de biofilme e virulência em duas cepas de *L. monocytogenes*, sorotipos 1/2a e 4b, cultivadas a 7°C e 37°C (condição controle), pela técnica de PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR). Para ambas as cepas, os genes *sigB*, *prfA*, *luxS*, *sufS*, *sufU*, *ltrC* e *flaA* apresentaram transcrição significativamente aumentada ( $p < 0,05$ ) a 7°C, em comparação aos resultados para a condição de cultivo a 37°C, enquanto que o gene *hly* não variou significativamente a sua transcrição entre as duas temperaturas. O gene *actA* foi mais transcrito a 7°C para a cepa denominada 55, do sorotipo 1/2a, enquanto que não variou significativamente a sua transcrição entre as duas condições de crescimento para a cepa denominada 47, do sorotipo 4b. No entanto, para a cepa 55, o gene *degU* não demonstrou diferença estatisticamente significativa entre seus níveis de transcrição nas duas temperaturas estudadas, mas para a cepa 47, apresentou transcrição significativamente aumentada a 7°C. Interessantemente, a presença do gene *agrA* não foi detectada na cepa 47, e os seus níveis de transcrição foram menores a 7°C para a cepa 55. Estes resultados demonstram que os dois sorotipos estudados, responsáveis por muitos dos casos humanos de listeriose, apresentam mecanismos moleculares diferentes, nas temperaturas de 7°C e 37°C.

**Palavras-chave:** *Listeria monocytogenes*, formação de biofilme, virulência, RTqPCR

## **Transcriptional analysis of genes related to biofilm formation and virulence in *Listeria monocytogenes* strains grown at different temperatures**

Author: Luiza Pieta

Advisor: Jeverson Frazzon

### **ABSTRACT**

Among the eight species of genus *Listeria*, the only transmitted by food, pathogenic for humans, is *Listeria monocytogenes*. Of great concern to the food industry, this microorganism can be found in various areas of food processing plants, being able to adhere and form persistent biofilms. In the present work, the influence of glucose concentration and incubation time on biofilm formation by a strain of *L. monocytogenes*, serotype 1/2a, grown in three different temperatures, 7°C, 25°C and 37°C, have been studied, through an experimental design using the Response Surface Methodology. The two variables tested, for the studied intervals, were significant ( $p < 0,05$ ) in the biofilm formation only at a temperature of 37°C and, both glucose concentrations tending to zero combined with incubation times near to 26 h, and higher glucose concentrations combined with lower incubation times, within the applied range study, represented good conditions for biofilm formation. Transcriptional analysis of genes related to biofilm formation and virulence in two strains of *L. monocytogenes*, serotypes 1/2a and 4b, grown at 7°C and 37°C (control condition), was also performed, by real-time quantitative PCR (RT-qPCR). For both strains, *sigB*, *prfA*, *luxS*, *sufS*, *sufU*, *ltrC* and *flaA* genes showed significantly increased transcription ( $p < 0,05$ ) at 7°C, in comparison with results for the growth condition at 37°C, whereas *hly* gene did not varied significantly its transcription between the two temperatures. The *actA* gene was more transcribed at 7°C for the 55 strain, serotype 1/2a, while did not varied significantly its transcription between the two growth conditions for the 47 strain, serotype 4b. However, for 55 strain, the *degU* gene did not showed statistically significant difference for its transcription levels between the two studied temperatures, but for 47 strain, presented significantly increased transcription at 7°C. Interestingly, the presence of *agrA* gene was not detected in 47 strain, and its transcription levels were lower at 7°C for 55 strain. These results demonstrate that the two studied serotypes, responsible for many of the human listeriosis cases, have different molecular mechanisms, at temperatures of 7 and 37°C.

**Keywords:** *Listeria monocytogenes*, biofilm formation, virulence, RT-qPCR

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Desenvolvimento de um biofilme, descrito como um processo de 5 fases. Fase 1: fixação inicial de células na superfície; Fase 2: produção da matriz extracelular de exopolissacarídeos; Fase 3: início do desenvolvimento da arquitetura do biofilme; Fase 4: amadurecimento da arquitetura do biofilme; Fase 5: dispersão de células bacterianas do biofilme (LASA, 2006).....	<b>18</b>
<b>Figura 2:</b> O ciclo celular de <i>Listeria monocytogenes</i> . 1: adesão a superfície das células epiteliais; 2: envolvimento da bactéria em um vacúolo fagocítico; 3: lise das membranas vacuolares; 4: formação das caudas de actina, que facilitam o movimento intracelular; 5: propagação para as células vizinhas e disseminação do processo infeccioso, através da formação de protuberâncias na membrana plasmática; 6: confinamento em um vacúolo secundário de dupla membrana, do qual a <i>L. monocytogenes</i> escapa e reinicia seu ciclo de vida (Adaptada de BONAZZI, LECUIT & COSSART, 2009).....	<b>21</b>
<b>Figura 3:</b> Gráfico de Pareto das variáveis tempo de incubação e concentração de glicose na resposta formação de biofilme por <i>Listeria monocytogenes</i> , a 7°C.....	<b>38</b>
<b>Figura 4:</b> Gráfico de Pareto das variáveis tempo de incubação e concentração de glicose na resposta formação de biofilme por <i>Listeria monocytogenes</i> , a 25°C.....	<b>39</b>
<b>Figura 5:</b> Gráfico de Pareto das variáveis tempo de incubação e concentração de glicose na resposta formação de biofilme por <i>Listeria monocytogenes</i> , a 37°C.....	<b>39</b>
<b>Figura 6A:</b> Formação de biofilme por <i>Listeria monocytogenes</i> a 37°C, observada como resposta da interação entre a concentração de glicose e o tempo de incubação.....	<b>40</b>
<b>Figura 6B:</b> Formação de biofilme por <i>Listeria monocytogenes</i> a 37°C, observada como resposta da interação entre a concentração de glicose e o tempo de incubação.....	<b>41</b>
<b>Figura 7:</b> Expressão relativa dos genes <i>agrA</i> , <i>degU</i> , <i>luxS</i> , <i>prfA</i> , <i>hly</i> , <i>actA</i> , <i>flaA</i> , <i>sigB</i> , <i>ltrC</i> , <i>sufS</i> e <i>sufU</i> normalizada com o gene <i>gap</i> , para as cepas 55 (sorotipo 1/2a) e 47 (sorotipo 4b), a 7°C e 37°C, e seus respectivos valores de desvio padrão.....	<b>44</b>

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Matriz e níveis dos fatores estudados, e total de tratamentos realizados.....	<b>29</b>
<b>Tabela 2:</b> Sequência dos <i>primers</i> utilizados na análise transcricional por RT-qPCR com os respectivos tamanhos dos fragmentos de amplificação..	<b>33</b>
<b>Tabela 3:</b> Sequência dos <i>primers</i> testados como normalizadores para a análise transcricional por RT-qPCR com os respectivos tamanhos dos fragmentos de amplificação.....	<b>34</b>
<b>Tabela 4:</b> Valores de adesão bacteriana (log UFC/cm <sup>2</sup> ) ao aço inoxidável, nas temperaturas de 7°C, 25°C e 37°C.....	<b>37</b>

# SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>11</b>
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>13</b>
2.1 Objetivo geral.....	13
2.1 Objetivos específicos.....	13
<b>3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>14</b>
3.1 Gênero <i>Listeria</i> .....	14
3.2 <i>Listeria monocytogenes</i> .....	15
3.3 Listeriose de origem alimentar.....	16
3.4 Formação de biofilme em indústrias de alimentos.....	17
3.5 Genes envolvidos na virulência de <i>Listeria monocytogenes</i> .....	19
3.6 Genes relacionados à formação de biofilme em <i>Listeria monocytogenes</i> .....	23
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>26</b>
4.1 Cepas bacterianas.....	26
4.2 Formação de biofilme.....	26
4.2.1 Preparação dos corpos de prova.....	26
4.2.2 Formação dos biofilmes sobre os corpos de prova.....	27
4.2.3 Análise da formação de biofilme.....	27
4.2.4 Planejamento experimental.....	28
4.3 Análise transcricional de genes envolvidos na virulência e formação de biofilme por <i>Listeria monocytogenes</i> .....	30
4.3.1 Isolamento de RNA total.....	31
4.3.2 Síntese de cDNA.....	32
4.3.3 PCR quantitativo em tempo real.....	32
4.3.4 Análise das expressões relativas.....	34
4.4 Análise estatística.....	35
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>36</b>
5.1 Formação de biofilme.....	36
5.2 Planejamento experimental.....	38

5.3 Análise transcricional.....	42
6. CONCLUSÕES.....	49
7. PERSPECTIVAS.....	50
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	51

## 1. INTRODUÇÃO

Dentre as oito espécies do gênero *Listeria* (HAIN *et al.*, 2012), a única patogênica aos humanos, transmitida por alimentos, é a *Listeria monocytogenes*. Esta se caracteriza por ser um microrganismo psicotrófico, amplamente distribuído no ambiente, com baixa dose infectante e causador da listeriose, doença severa com altas taxas de mortalidade (HOFER, DOS REIS & HOFER, 2006) normalmente associada a grupos de risco bem definidos, como idosos, crianças, recém-nascidos, gestantes e pessoas imunodeprimidas (MONTVILLE & MATTHEWS, 2008).

De grande preocupação para a indústria alimentícia, a *L. monocytogenes* pode ser encontrada em diversas superfícies de plantas processadoras de alimentos, sendo capaz de se aderir e formar persistentes biofilmes em uma variedade de materiais sólidos, tais como aço inoxidável, vidro e polímeros (HABIMANA *et al.*, 2009). Uma vez formados, estes biofilmes são bastante difíceis de serem eliminados, comprometendo assim a qualidade sanitária da indústria e resultando em diversos prejuízos para a empresa, tais como danos aos equipamentos, contaminação de produtos e perdas de energia (TRACHOO, 2003).

Durante um longo período, a *L. monocytogenes* evoluiu para adquirir um conjunto diversificado de genes e proteínas relacionadas, cada uma com suas propriedades e funções exclusivas na sobrevivência e patogenicidade deste microrganismo (LIU, 2006). Como exemplo pode-se citar o PrfA, um importante fator de transcrição que controla a passagem da bactéria de sua forma extracelular, impulsionada por flagelo, para sua forma patógena intracelular, além de regular positivamente a transcrição de diversos genes de virulência de *L. monocytogenes*. De acordo com estudos anteriores, este fator já foi indicado como um importante regulador da formação de biofilme por tal microrganismo (LEMON, FREITAG & KOLTER, 2010). Além dos genes de virulência, existem também os genes de resposta ao estresse, que no caso da *L. monocytogenes* são controlados pelo fator de transcrição Sigma B (SigB) (VAN DER VEEN & ABEE, 2010a), e alguns trabalhos já demonstraram o envolvimento deste fator na adaptação de *L. monocytogenes* a baixas temperaturas (BECKER *et al.*, 2000).

Em relação às tecnologias utilizadas em biologia molecular, o PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR) é um método bem estabelecido para estimar quantidades de sequências de mRNA, com grande sensibilidade em comparação a outros métodos quantitativos (VANGUILDER, VRANA & FREEMAN, 2008). Alguns autores o consideram como um método rápido que foi desenvolvido para apoiar ou até mesmo substituir técnicas tradicionais, capaz de avaliar informações quantitativamente e monitorar inóculos com baixa concentração bacteriana (REICHERT-SCHWILLINSKY *et al.*, 2009).

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

O objetivo do presente trabalho foi realizar uma análise transcricional de genes relacionados à formação de biofilme e virulência em cepas de *L. monocytogenes* cultivadas em diferentes temperaturas.

### 2.2 Objetivos específicos

- Identificar as melhores condições para formação de biofilme por uma cepa de *L. monocytogenes*, frente a diferentes concentrações de glicose e tempos de incubação, em três diferentes temperaturas de crescimento;
- Comparar dois diferentes sorotipos de *L. monocytogenes*, em relação aos níveis de transcrição gênica de genes envolvidos na virulência e na formação de biofilme pelo microrganismo, nas temperaturas de 7°C e 37°C;
- Traçar um panorama dos genes relacionados à formação de biofilme e virulência em *L. monocytogenes*.

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 Gênero *Listeria*

*Listeria* são bactérias Gram-positivas, anaeróbias facultativas, não-formadoras de esporos, em forma de bastonetes e com uma grande quantidade de pares de bases nitrogenadas formados por Guanina e Citosina (LIU, 2006). Além disso, são capazes de se multiplicar em uma vasta faixa de temperatura, que varia de 0°C a 42°C, e se movimentam com o auxílio de flagelos (FORSYTHE, 2010). O gênero é composto por 8 espécies (*L. monocytogenes*, *Listeria ivanovii*, *Listeria innocua*, *Listeria seeligeri*, *Listeria welshimeri*, *Listeria grayi*, *Listeria marthii* e *Listeria rocourtiaae*), sendo somente duas destas consideradas patogênicas: *L. monocytogenes*, patógena aos humanos; e *L. ivanovii*, patógena principalmente a animais, tais como ovinos e bovinos (MONTVILLE & MATTHEWS, 2008).

Por serem tolerantes a valores extremos de pH, temperatura e concentrações de sal (SLEATOR, GAHAN & HILL, 2003), *Listeria* spp. estão amplamente distribuídas no ambiente, sendo encontradas em uma variedade de reservatórios, tais como solos, plantas em decomposição, água, bovinos, leite e diversos alimentos processados (KHELEF *et al.*, 2006). Além disso, existem diversas formas de se contaminar com tais bactérias: por meio de animais, da poeira, do ar, de insetos, das fezes (cerca de 1 a 9% da população humana tem *L. monocytogenes* nas fezes), da ingestão de alimentos, ou através do contato com outras pessoas (JAY, 2005).

A transcrição de genes de virulência é essencial para que ocorra o processo de infecção, sendo determinada pela ação de reguladores globais como o PrfA, considerado o principal ativador dos genes de virulência no gênero *Listeria*, além de outros importantes reguladores, como o fator alternativo SigB (TOLEDO-ARANA *et al.*, 2009). Estes fatores são expressos em resposta às condições ambientais, e vale ressaltar que eles podem ter sua atividade influenciada por diferentes condições de pH, temperatura e fase de multiplicação da bactéria, como acontece no caso do PrfA (LARSEN, LEISNER & INGMER, 2010).

Como um importante aspecto para a indústria de alimentos, cabe destacar que *Listeria* spp. podem colonizar várias superfícies inertes, sendo capazes de formar biofilmes em áreas de processamento de alimentos (ROBERTS & WIEDMANN, 2003). Além disso, a presença destes biofilmes em superfícies que entram em contato com os alimentos, ou até mesmo nos próprios alimentos, acaba impactando negativamente na Segurança dos Alimentos (TRACHOO, 2003; FRANK, 2001).

### **3.2 *Listeria monocytogenes***

Sendo *L. monocytogenes* a única espécie de *Listeria* patogênica aos humanos transmitida por alimentos, este se torna um microrganismo importante tratando-se das enfermidades causadas pela ingestão de produtos alimentícios contaminados (FORSYTHE, 2010). Além disso, do ponto de vista econômico, a contaminação dos alimentos por *L. monocytogenes* é uma grande preocupação para as indústrias desta área (ALESSANDRIA *et al.*, 2010).

Quanto a sua fisiologia, *L. monocytogenes* se multiplica em valores de pH baixos, em torno de 4,4, podendo ser inibida por ácidos orgânicos, como ácido acético, cítrico e láctico, na concentração de 0,1%. Seu crescimento é acentuado em valores de atividade de água ( $a_w$ ) maiores ou iguais a 0,97, podendo sobreviver em valores bem mais baixos, em torno de 0,83. Determinadas concentrações de sal, em torno de 6,5%, também permitem seu crescimento (MONTVILLE & MATTHEWS, 2008).

Diversos alimentos podem estar contaminados com *L. monocytogenes*, mas ela tem sido frequentemente encontrada em leite cru, queijos (principalmente os de pasta mole), carnes frescas, frango, frutos do mar, frutas e produtos vegetais, tendo prevalência em leite e produtos lácteos, devido aos primeiros surtos notificados da doença (JAY, 2005). Mesmo sendo destruída durante a pasteurização e o cozimento dos produtos, *L. monocytogenes* pode contaminar alimentos prontos para o consumo, por exemplo, antes da sua embalagem (KHELEF *et al.*, 2006).

Existem treze diferentes sorotipos descritos para esta bactéria, sendo os sorotipos 1/2a, 1/2b e 4b os responsáveis pela maioria dos casos humanos de listeriose (PAN, BREIDT & GORSKI, 2010). O sorotipo 4b é o mais relacionado aos surtos da doença (37 a 64% dos casos), estando intimamente relacionado aos casos

envolvendo mulheres grávidas (FORSYTHE, 2010), enquanto que grande parte das cepas de *L. monocytogenes* isoladas de alimentos ou de plantas processadoras de alimentos pertencem ao sorotipo 1/2a (KATHARIOU, 2002). *L. monocytogenes* possui uma dose infectante baixa e contamina principalmente indivíduos imunodeprimidos, podendo ser letal em até 30% dos casos (DOUMITH *et al.*, 2004; VÁZQUEZ-BOLAND *et al.*, 2001).

É sabido que *L. monocytogenes* pode multiplicar-se lentamente em temperaturas de refrigeração, contrastando com a maioria dos demais patógenos alimentares reconhecidos. A fim de evitar a presença e multiplicação deste microrganismo, são necessárias algumas medidas de controle, tais como: pasteurização e esterilização do leite; prevenção da contaminação cruzada; refrigeração por um período limitado, seguida de reaquecimento; e recomendação para que não sejam consumidos produtos de alto risco de contaminação (por exemplo, leite cru ou produtos feitos a partir deste) por populações susceptíveis à bactéria, como as mulheres grávidas (FORSYTHE, 2010).

### **3.3 Listeriose de origem alimentar**

A listeriose é uma doença grave e um sério problema de saúde pública, que apresenta altas taxas de mortalidade (SWAMINATHAN & GERNER-SMIDT, 2007) e acomete principalmente idosos, recém-nascidos, gestantes e pessoas imunodeprimidas (FRECE *et al.*, 2010; VANEGAS *et al.*, 2009). Os principais sintomas da listeriose são meningite, encefalite, septicemia (*Listeria* na sua forma invasiva, capaz de atravessar a barreira intestinal, podendo alcançar diversos órgãos), gastroenterite e, em mulheres grávidas infectadas no segundo ou terceiro mês de gestação, pode causar aborto, nascimento prematuro ou nascimento do bebê já morto (FORSYTHE, 2010). Diversas condições podem predispor a listeriose em pessoas adultas, e dentre elas pode-se citar os neoplasmas, a AIDS, o alcoolismo, a diabetes (tipo 1, em particular), as doenças cardiovasculares, os transplantes renais e as terapias com corticóides (JAY, 2005; MONTVILLE & MATTHEWS, 2008).

O consumo de produtos alimentícios contaminados é responsável por 99% dos casos de listeriose em humanos (NIGHTINGALE, WINDHAM & WIEDMANN,

2005), sendo a dose infectante influenciada tanto pela susceptibilidade do hospedeiro quanto pela linhagem envolvida (MCLAUHLIN *et al.*, 2004). A respeito da quantidade de microrganismos ingeridos necessários para o surgimento da doença, somente  $10^2$  UFC (Unidades Formadoras de Colônia) por grama ou mililitro de alimento já são capazes de causar a listeriose (JEMMI & STEPHAN, 2006).

Importante ressaltar ainda a diferença entre os surtos de gastroenterite e os surtos por *Listeria* na sua forma invasiva. Os primeiros afetam pessoas sem fatores de risco predisponentes, sendo necessária uma dose infectante maior para causar a doença. Os sintomas aparecem em algumas horas após a exposição ao microrganismo, em contraste à listeriose invasiva, na qual os sintomas aparecem depois de algumas semanas do contato com a bactéria (MONTVILLE & MATTHEWS, 2008). Devido à possibilidade dos humanos serem portadores assintomáticos de *Listeria*, se torna muito difícil definir a frequência com que ocorrem casos de listeriose gastrointestinal não-invasiva (SLUTSKER & SCHUCHAT, 1999).

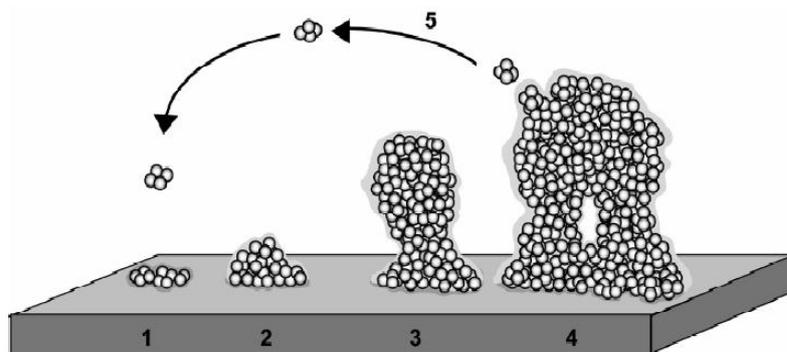
### **3.4 Formação de biofilme em indústrias de alimentos**

Em contraste a sua patogenicidade, pouco ainda é conhecido sobre o mecanismo de formação de biofilme por *L. monocytogenes* (LEMON, FREITAG & KOLTER, 2010) e quais os mecanismos moleculares envolvidos nesse processo (SUO *et al.*, 2012). A capacidade das bactérias de trocar informações entre as células e de adaptar sua fisiologia quando expostas a mudanças provocadas no ambiente é um mecanismo de interesse para os microbiologistas há bastante tempo, e que ainda não foi totalmente esclarecido. Este fenômeno de comunicação entre as células, denominado “*Quorum-sensing*”, foi descrito pela primeira vez por Nealson, Platt e Hastings (1970), e envolve a síntese de moléculas sinalizadoras denominadas autoindutoras, que induzem a regulação dos genes a serem transcritos (GARMYN *et al.*, 2009).

Devido a sua ampla distribuição no ambiente, muitas matérias-primas utilizadas pela indústria podem apresentar contaminação por *L. monocytogenes*, que acaba então sendo transferida para dentro das instalações processadoras de alimentos, podendo ocasionar assim a formação de biofilmes em equipamentos e

superfícies (VAN DER VEEN & ABEE, 2010b). Depois de formados, estes biofilmes são bastante difíceis de serem removidos, tanto dos alimentos preparados quanto das superfícies contaminadas (KATHARIOU, 2002), já que se comportam como uma forma de proteção aos microrganismos frente às condições de estresses provenientes dos ambientes processadores de alimentos (GANDHI & CHIKINDAS, 2007). Em função disso, bactérias em biofilmes são mais resistentes, por exemplo, a dessecação, a ação da luz ultravioleta e de sanitizantes e a antimicrobianos (PURKRTOVA *et al.*, 2010).

Tais biofilmes são definidos como um ambiente complexo e dinâmico, sendo a sua formação composta basicamente pelo ataque, colonização e multiplicação de microrganismos em uma determinada superfície. As propriedades físico-químicas desta superfície são importantes para a adesão inicial, e a formação de biofilmes deve ocorrer na presença de água, através da liberação de exopolissacarídeos (EPS), que são utilizados para a aderência dos microrganismos em diversos tipos de materiais (TRACHOO, 2003). O processo de formação de biofilme está esquematizado mais detalhadamente na Figura 1 abaixo.



**Figura 1:** Desenvolvimento de um biofilme, descrito como um processo de 5 fases. Fase 1: fixação inicial de células na superfície; Fase 2: produção da matriz extracelular de exopolissacarídeos; Fase 3: início do desenvolvimento da arquitetura do biofilme; Fase 4: amadurecimento da arquitetura do biofilme; Fase 5: dispersão de células bacterianas do biofilme (LASA, 2006).

Fatores como a presença de cápsula, de fímbrias, e a hidrofobicidade da superfície celular devem ser levados em conta, já que influenciam na formação dos biofilmes microbianos (FRANK, 2001). Além disso, o flagelo, que proporciona motilidade a *L. monocytogenes*, assume grande importância neste processo, uma

vez que a sua presença é fundamental na aderência inicial às superfícies abióticas (LEMON, HIGGINS & KOLTER, 2007; TODHANAKASEM & YOUNG, 2008).

Diversos outros fatores ambientais, como temperatura, concentração de sal e açúcar, pH e nutrientes, comumente encontrados tanto em alimentos como em ambientes processadores destes, também são importantes na adesão inicial e posterior formação de biofilme por *L. monocytogenes* (MORETRO & LANGSRUD, 2004).

### 3.5 Genes envolvidos na virulência de *Listeria monocytogenes*

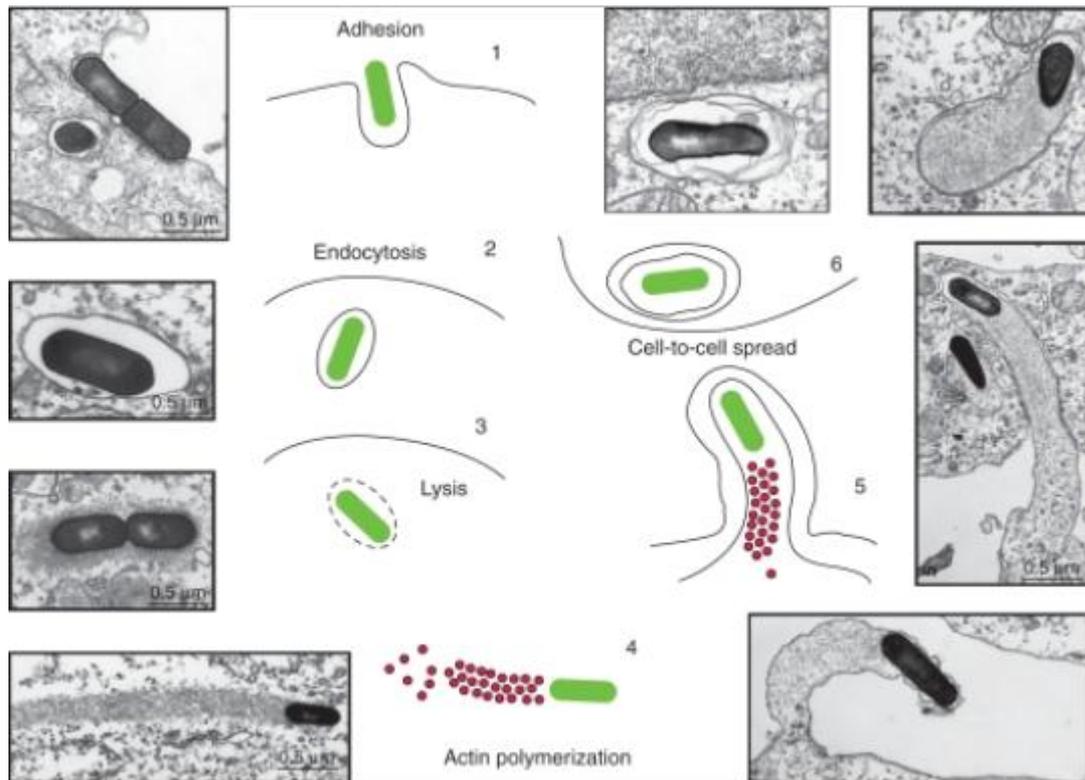
Após a ingestão de alimento contaminado com *L. monocytogenes*, esta deve resistir a condições de estresse existentes no hospedeiro, tais como a presença de enzimas proteolíticas e de sais biliares, além da acidez estomacal (pH ~ 2,0) (SLEATOR, GAHAN & HILL, 2003). O fator Sigma B é ativado após a exposição a diversas destas condições de estresse ambiental, regulando genes que contribuem para a sobrevivência da bactéria nestas situações. Além da regulação de genes de resposta ao estresse, a transcrição de diversos genes de virulência, como *bsh*, *inIA*, *inIB* e também o *prfA*, é parcialmente Sigma B-dependente (RAENGPRADUB, WIEDMANN & BOOR, 2008). Diversos outros genes de virulência essenciais para a sobrevivência intracelular de *L. monocytogenes*, como *hly*, *mpl*, *plcA*, *plcB* e *actA*, têm sua transcrição regulada pelo fator PrfA (OLLINGER *et al.*, 2009).

Após o estágio inicial de sobrevivência às condições adversas citadas anteriormente, *L. monocytogenes* adere e penetra nas células do hospedeiro com a ajuda de proteínas denominadas internalinas (GAILLARD *et al.*, 1991), sendo que as mais conhecidas são InIA e InIB, codificadas pelos genes *inIA* e *inIB*, respectivamente. Logo após a internalização, é necessária a ruptura da membrana fagossômica, dentro da qual se encontra a bactéria, para que esta alcance o citosol. Este procedimento é realizado por duas moléculas: listeriolisina O (LLO, proteína codificada pelo gene *hly*), essencial para a virulência de *L. monocytogenes* (PORTNOY *et al.*, 1992), e fosfatidil-inositol-fosfolipase C (PI-PLC, proteína codificada pelo gene *plcA*). A proteína PI-PLC atua em sinergia com a proteína PC-PLC (fosfatidilcolina-fosfolipase C, codificada pelo gene *plcB*), auxiliando a LLO na lise dos vacúolos primários (VÁZQUEZ-BOLAND *et al.*, 2001).

Para a mobilidade intracelular e passagem de uma célula para outra, é necessária a presença de uma proteína de superfície, denominada ActA (codificada pelo gene *actA*) que, cotranscrita com a proteína PC-PLC, é responsável pela formação das caudas de actina, que impulsionam a bactéria em direção a membrana citoplasmática (LIU, 2006). Passando a membrana citoplasmática, com o intuito de disseminar-se para a célula vizinha, a bactéria acaba sendo envolvida novamente, agora por um vacúolo secundário de dupla membrana. Neste momento, entra em ação a metaloprotease Mpl (codificada pelo gene *mpl*) que, contribuindo para a ativação da proteína PC-PLC (BITAR, CAO & MARQUIS, 2008), é responsável pela lise deste segundo vacúolo, iniciando assim um novo ciclo infeccioso (VÁZQUEZ-BOLAND *et al.*, 2001).

A temperatura é muitas vezes utilizada como um sinal para controlar a transcrição de genes de virulência necessários para a infecção ou genes necessários para a persistência no meio ambiente. No entanto, muito pouco se sabe sobre os mecanismos moleculares que permitem as bactérias se adaptarem e responderem a flutuações de temperatura (KAMP & HIGGINS, 2011). Sabe-se que a transcrição de diversos genes envolvidos na virulência de *L. monocytogenes* e do fator PrfA, que regula a transcrição dos mesmos, é regulada pela temperatura. Além disso, os genes de virulência são geralmente mais transcritos a 37°C, enquanto que a 30°C seus níveis de transcrição são relativamente baixos (JOHANSSON *et al.*, 2002). Muitas bactérias patogênicas, ao detectar a temperatura fisiológica dos mamíferos de 37°C, acabam sofrendo mudanças na transcrição e tradução de seu material genético, tendo isto um grande efeito sobre a sua fisiologia, sobrevivência e virulência (KAMP & HIGGINS, 2011).

A Figura 2 demonstra como ocorre o processo de infecção por *Listeria* no hospedeiro.



**Figura 2:** O ciclo celular de *Listeria monocytogenes*. 1: adesão a superfície das células epiteliais; 2: envolvimento da bactéria em um vacúolo fagocítico; 3: lise das membranas vacuolares; 4: formação das caudas de actina, que facilitam o movimento intracelular; 5: propagação para as células vizinhas e disseminação do processo infeccioso, através da formação de protuberâncias na membrana plasmática; 6: confinamento em um vacúolo secundário de dupla membrana, do qual a *L. monocytogenes* escapa e reinicia seu ciclo de vida (Adaptada de BONAZZI, LECUIT & COSSART, 2009).

Diversos genes de resposta ao estresse, responsáveis pela sobrevivência de *L. monocytogenes* em ambientes desfavoráveis ao seu desenvolvimento, são controlados pelo fator de transcrição Sigma B. O sistema de resistência ácida glutamato decarboxilase (GAD), codificado pelos genes *gad* (como *gadA*, *gadB*, *gadC*, *gadD* e *gadE*) é de extrema importância para a adaptação de *L. monocytogenes* em condições ácidas, tendo já sido indicado seu envolvimento na sobrevivência deste microrganismo no fluido gástrico (COTTER, GAHAN & HILL, 2001). *L. monocytogenes* está intimamente relacionada ao microrganismo Gram-positivo *Bacillus subtilis* (GUERIRI *et al.*, 2008) e, enquanto o gene *ctc* em *B. subtilis* é induzido em resposta ao estresse osmótico, oxidativo, estresse por calor e frente a

limitação de glicose, em *L. monocytogenes* sua ação é restrita a tolerância osmótica (GARDAN *et al.*, 2003). Outros exemplos de importantes genes são o *clpC*, que atua contribuindo para o escape da *L. monocytogenes* do fagossomo (CHATURONGAKUL & BOOR, 2006), o gene *ltrC*, gene de resposta ao estresse causado pelo frio e responsável pela multiplicação e adaptação de *L. monocytogenes* em temperaturas de refrigeração (CHAN, BOOR & WIEDMANN, 2007), e os genes *sufS* (cisteína desulfurase) e *sufU*, envolvidos na biogênese, pelo fornecimento de enxofre, e construção dos centros de Ferro-Enxofre ([Fe-S] *clusters*), respectivamente.

Diversos estudos vêm sendo realizados com os genes envolvidos na virulência de *L. monocytogenes*, e novas descobertas sobre suas funções e mecanismos de ação começam a surgir. O gene *hly*, por exemplo, que é muito conhecido devido a sua importância no processo de invasão da célula hospedeira, já vem sendo utilizado para a detecção específica de *L. monocytogenes* em produtos alimentícios (LE MONNIER *et al.*, 2011). Outro estudo, que comparou a multiplicação de *L. monocytogenes* em meio de cultura BHI (*Brain Heart Infusion* = Caldo Infusão de Cérebro e Coração) com um meio mínimo contendo distintos carboidratos fermentáveis ou não fermentáveis, demonstrou que a ativação do fator de transcrição PrfA difere nestas diferentes condições de crescimento, comprovando que o meio utilizado para a multiplicação bacteriana influencia no tipo de proteínas relacionadas a virulência que serão sintetizadas (GARCÍA-DEL PORTILLO *et al.*, 2011).

A respeito do gene *actA*, pesquisadores evidenciam o seu envolvimento também na ruptura do fagossomo e escape da bactéria (POUSSIN & GOLDFINE, 2010), e uma relação deste gene com o gene de virulência *iap*, envolvido na invasão dos macrófagos, já foi descrita, uma vez que a não-transcrição do gene *iap* afeta o movimento intracelular e a disseminação da bactéria de uma célula para outra, devido a impossibilidade de formação da cauda de actina (PILGRIM *et al.*, 2003). Além disso, o estudo de Ghanem e seus colaboradores (2012) demonstrou a ocorrência de um processo infeccioso por *L. monocytogenes* no intestino de camundongos, apesar da não-expressão da proteína InIA. Também foi relatada nesse estudo uma nova função para tal proteína, através do seu envolvimento na disseminação das bactérias pelo hospedeiro, após o início do processo infeccioso.

### 3.6 Genes relacionados à formação de biofilme em *Listeria monocytogenes*

Já foram descritos na literatura importantes genes que estão envolvidos no mecanismo de formação de biofilme por *L. monocytogenes*. Os sistemas de dois componentes (TCSs = *Two-Component Systems*), compostos por um par de proteínas combinadas, estão envolvidos no processo de esporulação, virulência, na formação de biofilme e também na síntese de enzimas extracelulares, em diversas bactérias (GUERIRI *et al.*, 2008). A análise da sequência genômica de *L. monocytogenes* revela a presença de 17 TCSs (GLASER *et al.*, 2001), dentre os quais destaca-se o sistema CheA/CheY. Este sistema controla a quimiotaxia e motilidade em *L. monocytogenes*, sendo codificado pelos genes *cheA* e *cheY*, que se encontram imediatamente a jusante do gene *flaA*, codificador da flagelina, subunidade maior do filamento flagelar de *L. monocytogenes* (DONS *et al.*, 2004). A transcrição dos genes *flaA*, *cheY* e *cheA* é acentuada a 25°C, mas não detectável a 37°C (DONS, OLSEN & RASMUSSEN, 1994). Concordando com essa afirmação, Kamp e Higgins (2011) afirmam que, ao entrar no hospedeiro, *L. monocytogenes* reprime a transcrição de genes flagelares de motilidade em resposta à temperatura fisiológica dos mamíferos de 37°C, sendo a regulação negativa da motilidade flagelar necessária para a virulência.

Outro importante TCS, proveniente de *Bacillus subtilis*, é o sistema DegS/DegU. No caso de *L. monocytogenes*, o gene que codifica a proteína DegS está ausente, embora um ortólogo do gene *degU* esteja presente, desempenhando independentemente um papel importante na motilidade e virulência do microrganismo (KNUDSEN, OLSEN & DONS, 2004). Outros estudos já relataram inclusive o envolvimento da proteína DegU não só na síntese do flagelo, motilidade e virulência, mas também sua ação na formação de biofilme (GUERIRI *et al.*, 2008).

Dentre os genes que influenciam na formação de biofilme, destacam-se os do sistema *agr* de *Staphylococcus aureus* e outros estafilococos, que é amplamente conservado em bactérias Gram-positivas com grande quantidade de pares de base Guanina-Citosina, como no caso da *L. monocytogenes* (LYON & NOVICK, 2004). Em *L. monocytogenes*, os genes *argB*, *agrC*, *agrD* e *agrA* estão organizados na forma de um *operon*, e experimentos de PCR quantitativo em tempo real indicaram que os níveis de transcrição de *agrBCDA* dependem do estágio de desenvolvimento do biofilme, uma vez que tais valores foram menores após a adesão inicial, em

comparação ao período de crescimento do biofilme (RIEU *et al.*, 2007). Além disso, de acordo com pesquisas anteriores, a deleção em fase dos genes *agrA* e *agrD* resultou em alterada aderência e formação de biofilme em superfícies abióticas, sugerindo o envolvimento do sistema *agr* de *L. monocytogenes* durante os primeiros estágios da formação de biofilme, enquanto demais estudos demonstraram que a ausência do gene *agrD* em *L. monocytogenes* diminui a formação de biofilme, além de afetar a capacidade do microrganismo em transcrever diversos genes de virulência, como *inlA*, *hlyA*, *actA* e *plcA* (RIEDEL *et al.*, 2009). Outro gene importante que deve ser citado é o *luxS* pois, interessantemente, a sua presença acaba influenciando negativamente na formação de biofilme (SELA *et al.*, 2006).

Os fatores requeridos para a formação de biofilme por *L. monocytogenes* são ainda, em grande parte, desconhecidos (SUO *et al.*, 2012). Para diversos microrganismos já foi demonstrado que a formação de biofilme está relacionada ao estresse oxidativo em resposta a mudanças na adaptação às condições ambientais (BITOUN *et al.*, 2011), e esse estresse oxidativo pode ser induzido no interior dos biofilmes, afetando o crescimento das bactérias e resultando na produção de diversas espécies reativas de oxigênio (BOLES & SINGH, 2008), altamente tóxicas e que podem danificar ácidos nucleicos, proteínas e ácidos graxos da membrana celular (DRÖGE, 2003). Para evitar que ocorram esses danos, as células possuem sistemas de defesa com capacidade para desintoxicar as espécies reativas de oxigênio, incluindo genes que neutralizam o oxigênio reativo, como as superóxido dismutases (*sod*) e as catalases (*kat*); reguladores de estresse, que controlam a transcrição de genes antioxidantes, como *perR* e *sigB*; e genes de reparo ao DNA, como *recA*. Através do estudo da função desses genes, foi verificado que alguns deles (*sod*, *sigB* e *recA*) são induzidos durante a formação de biofilme por *L. monocytogenes* (TREMOULET *et al.*, 2002; VAN DER VEEN & ABEE, 2010a; VAN DER VEEN & ABEE, 2010b).

Análises do genoma de *L. monocytogenes* EGD-e identificaram uma proteína putativa, ancorada a parede celular (Lmo0435 [BapL]), a qual demonstrou semelhança com as proteínas envolvidas na formação de biofilme por estafilococos (CUCARELLA *et al.*, 2001). Uma mutação por inserção foi construída em *L. monocytogenes* para determinar a influência desta proteína na aderência a superfícies abióticas, e os resultados demonstraram que ela pode contribuir para a adesão de cepas de *L. monocytogenes* a superfícies. Importante ressaltar que esta

proteína não é requisito essencial para todas as cepas de *L. monocytogenes*, e que muitos isolados que não a contém demonstraram capacidade de adesão a superfícies abióticas, equivalentes àsquelas das cepas contendo a proteína (JORDAN *et al.*, 2008). Diferentemente do que acontece com *Staphylococcus aureus*, a proteína Bap não está implicada na virulência de *L. monocytogenes* (CUCARELLA *et al.*, 2004).

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Cepas bacterianas

Neste estudo, foram utilizadas cepas de *L. monocytogenes* isoladas de queijos e cedidas pelo Laboratório Nacional Agropecuário do Rio Grande do Sul (LANAGRO), do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), sorotipificadas pelo Instituto Oswaldo Cruz (RJ). Em um primeiro momento, as cepas bacterianas foram ativadas através de cultivo em Caldo Infusão de Cérebro e Coração (caldo BHI) com 0,6% de extrato de levedura, por 18-24 h a 37°C, sob agitação (30 rpm). As culturas foram então inoculadas em placas contendo o meio Ágar Triptose de Soja suplementado com 0,6% de extrato de levedura (TSA-YE – *Tryptose Soy Agar-Yeast Extract*), e incubadas por 48 h, a 37°C. A confirmação da pureza das culturas ocorreu através do método de Coloração de Gram e pela verificação da característica morfológica das colônias em meio sólido seletivo para *Listeria* (LEB – *Listeria Enrichment Broth*, 2% de ágar).

### 4.2 Formação de biofilme

A formação de biofilme em corpos de prova de aço inoxidável foi realizada através de ensaio proposto por Rossoni e Gaylarde (2000), com algumas adaptações, descritas a seguir.

#### 4.2.1 Preparação dos corpos de prova

Previamente aos ensaios de adesão bacteriana, corpos de prova de aço inoxidável (AISI 316), com área total igual a 10,06 cm<sup>2</sup>, foram imersos em solução de detergente neutro a 0,3%, por 1 hora, e esfregados, sendo em seguida enxaguados com água destilada, pulverizados com álcool etílico 70% para desinfecção e secos a

60°C em estufa. Após, foram autoclavados a 121°C, por 15 minutos, e mantidos em recipiente hermeticamente fechado até o momento do ensaio.

#### **4.2.2 Formação dos biofilmes sobre os corpos de prova**

Para este experimento, foi selecionada uma cepa de *L. monocytogenes* do sorotipo 1/2a, denominada cepa 55. Colônias típicas desta cepa foram cultivadas em placas de meio LEB sólido e semeadas em 20 mL de caldo BHI com 0,6% de extrato de levedura, com posterior incubação a 37°C por 18-24 h, sob agitação (30 rpm). Desta cultura, 1 mL foi retirado e adicionado em frascos contendo 99 mL de caldo Triptona de Soja (TSB) com diferentes concentrações de glicose (0; 0,75; 1,5 e 1,8%), totalizando um volume final de 100 mL em cada um deles. Estas suspensões bacterianas foram então utilizadas para a formação dos biofilmes sobre os corpos de prova.

Os corpos de prova, esterilizados previamente, foram imersos nas suspensões bacterianas contendo glicose ou não, onde ficaram por diferentes tempos (0,62; 8; 26; 44 e 51,38h) em três diferentes temperaturas (7°C, como exemplo de temperatura de refrigeração; 25°C, temperatura ambiente; e 37°C, temperatura ótima de multiplicação do microrganismo), de acordo com o planejamento experimental detalhado mais adiante, no item 4.2.4.

#### **4.2.3 Análise da formação de biofilme**

Após os corpos de prova permanecerem imersos nas suspensões bacterianas contendo ou não glicose, por diferentes tempos, em três temperaturas, procedeu-se a lavagem dos mesmos com 1 mL de água destilada estéril, a fim de serem removidas as células fracamente aderidas, e em seguida cada um foi colocado em recipiente contendo 50mL de Água Peptonada a 0,1% e imediatamente sonificado em um disruptor de células ultrassônico (USC 700, UNIQUE) durante 10 minutos, para que todas as células aderidas se soltassem da superfície testada (SINDE & CARBALLO, 2000). Diluições decimais seriadas foram realizadas, e uma alíquota de 20 µL de cada uma delas semeada em placas de meio TSA-YE, pelo

Método de Gota (SILVA, JUNQUEIRA & SILVEIRA, 2001), com incubação a 37°C, por 24-48 h, para contagem das colônias.

#### ***4.2.4 Planejamento experimental***

Para cada uma das temperaturas analisadas, os níveis de concentração de glicose e tempo de incubação foram estudados através de planejamento experimental, utilizando a Metodologia de Superfície de Resposta (MSR), tendo como resposta a formação de biofilme (descrita no item 4.2.2).

Para este experimento de dois fatores, foi realizado um planejamento experimental em estrela baseado em um experimento fatorial completo  $2^2$ , que consistiu em quatro pontos, com três repetições no ponto central e quatro pontos em estrela (pontos onde um dos fatores fica distanciado do ponto central de  $\pm \alpha$ , enquanto os outros dois fatores ficam posicionados no nível zero).

A Tabela 1 apresenta os níveis de cada fator e o total de tratamentos.

**Tabela 1:** Matriz e níveis dos fatores estudados, e total de tratamentos realizados.

Tratamento	Valores Codificados		Valores Reais	
	$x_1$	$x_2$	Concentração de Glicose (%)	Tempo (horas)
<b>1</b>	-1	-1	0	8
<b>2</b>	+1	-1	1,5	8
<b>3</b>	-1	+1	0	44
<b>4</b>	+1	+1	1,5	44
<b>5</b>	-1,41	0	0	26
<b>6</b>	0	-1,41	0,75	0,62
<b>7</b>	+1,41	0	1,80	26
<b>8</b>	0	+1,41	0,75	51,38
<b>9</b>	0	0	0,75	26
<b>10</b>	0	0	0,75	26
<b>11</b>	0	0	0,75	26

A equação de regressão foi desenvolvida através da codificação dos fatores testados, de acordo com a seguinte equação:

$$x_i = (X_i - X_o) / \Delta X_i$$

Onde  $x_i$  é o valor codificado da  $i$ -ésima variável independente;  $X_i$  é o valor não codificado (real) da  $i$ -ésima variável independente;  $X_o$  é o valor não codificado da  $i$ -ésima variável independente no ponto central; e  $\Delta X_i$  é a variação entre estes dois valores. Para um sistema de três fatores, a equação modelo é a seguinte:

$$Y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_{12}x_1x_2$$

Onde:

$Y$  é o potencial de formação de biofilme (UFC/cm<sup>2</sup>);

$b_0$ , a intersecção;

$b_1$ ,  $b_2$  e  $b_{12}$ , os coeficientes da equação;

$x_1$  é o valor codificado do fator concentração de glicose,  $x_2$  é o valor codificado do fator tempo de incubação; e

$x_1x_2$  é a interação entre os fatores concentração de glicose e tempo de incubação.

### **4.3 Análise transcricional de genes envolvidos na virulência e formação de biofilme por *Listeria monocytogenes***

Foi analisada a transcrição de genes envolvidos na virulência e na formação de biofilme por *L. monocytogenes* em cepas cultivadas sob temperatura de refrigeração de 7°C, e a 37°C, temperatura ótima de multiplicação para *L. monocytogenes* e condição controle para os experimentos de RT-qPCR.

#### **4.3.1 Isolamento de RNA total**

O isolamento do RNA total das cepas de *L. monocytogenes* 55 (sorotipo 1/2a) e 47 (sorotipo 4b) foi realizado pelo método Brometo de Cetiltrimetilamônio (método CTAB), modificado para células bacterianas (SALTER & CONLON, 2007). As cepas bacterianas foram cultivadas em caldo TSB em duas diferentes temperaturas, 7°C e 37°C, e quando o inóculo atingiu valores de densidade ótica (DO) entre 0,3 e 0,4 (bactéria na fase exponencial do seu crescimento), foram coletados 1,5 mL, sendo então centrifugados a 13000 rpm por 3 minutos, repetindo este procedimento 3 vezes. Após lavagem das células com 300 µL de tampão TE 1X (Tris-HCl 10 mM pH 8,0; EDTA 1 mM pH 8,0) e posterior centrifugação a 13000 rpm por 3 minutos, o *pellet* formado foi ressuscitado em 100 µL de tampão TE 1X e foram adicionados 3 µL de lisozima (10 mg/mL), com posterior incubação a 37°C por 20 minutos. Este material foi novamente centrifugado a 13000 rpm por 3 minutos, e então adicionou-se 300 µL de EB-CTAB (100 mM de Tris-HCl pH 9,0; 2,0% de Brometo de Cetiltrimetilamônio; 25 mM de EDTA; 2,0 M de NaCl; 2,0% de Polivinilpirrolidona – PVP-40; 0,5 g/L de espermidina), com posterior incubação a 60°C por 20 minutos. Após esta etapa, 400 µL de uma solução de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1) foram misturados ao material, que foi então centrifugado a 12000 rpm por 5 minutos. Da fase aquosa, 300 µL foram transferidos para um novo microtubo, e esta solução, adicionada de 300 µL de isopropanol, foi então incubada à -20°C, por pelo menos 30 minutos. Após centrifugação a 12000 rpm por 15 minutos (4°C), o sobrenadante foi descartado e 300 µL de etanol 70% foram adicionados, com nova centrifugação a 4°C e 12000 rpm, por mais 3 minutos. O etanol foi descartado, e o RNA seco ao ar por pelo menos 30 minutos. Ao final, este RNA foi ressuscitado em 50 µL de tampão TE 1X, e foram feitas leituras no espectrofotômetro, a 260 e 280 nm, em cubetas de quartzo, para verificar a qualidade do material obtido. A extração de RNA foi realizada em triplicata, para cada cepa bacteriana, nas duas diferentes temperaturas.

### 4.3.2 Síntese de cDNA

Em um primeiro momento, foi realizado o tratamento com a enzima DNase, para eliminar a presença de moléculas de DNA que foram extraídas juntamente com o RNA. Para isso, foi calculada a quantidade de RNA total de cada amostra, através do valor da absorbância a 260 nm, e os RNAs foram padronizados, de forma que em 10 µL de uma solução contendo enzima DNase I (Fermentas), tampão de reação 10X (100 mM Tris-HCl (pH 7,5 a 25°C); 25 mM MgCl<sub>2</sub>; 1 mM CaCl<sub>2</sub> - Fermentas) e água, fosse adicionado 1 µg de RNA. Estes 10 µL foram incubados a 37°C por 30 minutos, e então foi adicionado 1 µL de EDTA (Fermentas), com novo aquecimento a 65°C, por 10 minutos. Dando início a síntese do DNA complementar, a segunda etapa consistiu na adição de 1 µL de oligodT(20) 10 µM (Invitrogen), com posterior incubação a 70°C por 10 minutos, e a última etapa consistiu na adição de 25 µL de um mix de reação (5 µL de tampão de reação 5X; 1,25 µL de cada dATP/dCTP/dGTP/dTTP 10 mM; 25 U de RNasin®; 200 U de enzima transcriptase reversa M-MLV; água até o volume final – reagentes Promega) e posterior aquecimento a 40°C por 60 minutos. Experimentos de PCR convencional foram realizados com todas as amostras, incluindo amostras tratadas somente com a enzima DNase, para verificar se a síntese de cDNA foi realizada corretamente.

### 4.3.3 PCR quantitativo em tempo real

A verificação da expressão gênica relativa foi realizada através de experimentos de PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR). *Primers* internos aos genes de interesse analisados neste estudo (*agrA*, *degU*, *luxS*, *prfA*, *hly*, *actA*, *flaA*, *sigB*, *ltrC*, *sufS* e *sufU*) foram desenhados (ferramenta disponível em <http://www.genscript.com>) utilizando sequência genômica de *L. monocytogenes* (Tabela 2), e os genes *rpoB*, *16SrRNA* (VAN DER VEEN & ABEE, 2010a) e *gap* foram testados como constitutivos para posterior normalização dos dados obtidos (Tabela 3).

**Tabela 2:** Sequência dos *primers* utilizados na análise transcricional por RT-qPCR com os respectivos tamanhos dos fragmentos de amplificação.

<b>Gene</b>	<b>Sequência nucleotídica</b>	<b>Tamanho do produto (pb)</b>
<b><i>agrA</i></b>	5' CGGGTACTTGCCTGTATGAA 3'	149
	5' TGAATAGTTGGCGCTGTCTC 3'	
<b><i>degU</i></b>	5' GGCGCGTATATTCATCCAC 3'	150
	5' TACCTCGCACTCTCTATGCG 3'	
<b><i>luxS</i></b>	5' CATTGATGGCAGAACTTGC 3'	127
	5' TGATTTGAGTGCATCATCA 3'	
<b><i>prfA</i></b>	5' GGAAGCTTGGCTCTATTTGC 3'	145
	5' ACAGCTGAGCTATGTGCGAT 3'	
<b><i>hly</i></b>	5' AGCTCATTTACATCGTCCA 3'	124
	5' TGGTAAGTTCCGGTCATCAA 3'	
<b><i>actA</i></b>	5' AGAAATCATCCGGGAAACAG 3'	147
	5' CCTCTCCCGTTCAACTCTTC 3'	
<b><i>flaA</i></b>	5' GTAAGCATCCAAGCGTCTGA 3'	148
	5' AAGAATCAGCATCAGCAACG 3'	
<b><i>sigB</i></b>	5' TGGTGTCACGGAAGAAGAAG 3'	135
	5' TCCGTACCACCAACAACATC 3'	
<b><i>ltrC</i></b>	5' TACGGCGTCGATGAGATACT 3'	144
	5' GAATGTGTGAACGGCGATAC 3'	
<b><i>sufS</i></b>	5' GAATTTGGCGGAGAAATGAT 3'	137
	5' TCTGCCAAGTAATCAATCGC 3'	
<b><i>sufU</i></b>	5' TTCAGAAATGGTGCAAGGTC 3'	135
	5' ATCGCTCTCTCCATTGCTTT 3'	

**Tabela 3:** Sequência dos *primers* testados como normalizadores para a análise transcricional por RT-qPCR com os respectivos tamanhos dos fragmentos de amplificação.

Gene	Sequência nucleotídica	Tamanho do produto (pb)
<b><i>rpoB</i></b>	5' CGTCGTCTTCGTTCTGTTGG 3'	82
	5' GTTCACGAACCCACACGTTCC 3'	
<b><i>gap</i></b>	5' CGCTTACACTGGTGACCAAA 3'	119
	5' CGATAGCTTTAGCAGCACCA 3'	
<b>16SrRNA</b>	5' GATGCATAGCCGACCTGAGA 3'	116
	5' TGCTCCGTCAGACTTTCGTC 3'	

Para os experimentos de RT-qPCR foi preparado um mix, contendo 0,1  $\mu\text{M}$  de cada *primer* (*sense* e *anti-sense* – Invitrogen); 25  $\mu\text{M}$  de dNTPs (Promega); 1X tampão de reação (Invitrogen); 3 mM de  $\text{MgCl}_2$  (Invitrogen); 1X SYBR *green* (Bio-Rad); 0,25 U de enzima *Platinum Taq* DNA Polimerase (Invitrogen); e água para completar o volume final de 10  $\mu\text{L}$ .

Uma curva de diluição com os cDNAs das amostras (diluições 1:25; 1:50; 1:75; 1:100) foi feita, para verificar qual concentração apresentava melhor eficiência na reação de RT-qPCR, e 10  $\mu\text{L}$  de cada cDNA diluído foi adicionado aos 10  $\mu\text{L}$  do mix de reação, totalizando um volume final de 20  $\mu\text{L}$ .

A amplificação do DNA complementar foi realizada em aparelho ABI-7500 (Applied Biosystems), com microplacas de poliestireno contendo 96 poços, e todos os experimentos foram realizados em triplicatas biológicas e quadruplicatas experimentais.

#### 4.3.4 Análise das expressões relativas

Primeiramente, os genes constitutivos *rpoB*, *gap* e *16SrRNA* foram testados quanto ao seu potencial como genes normalizadores para os resultados obtidos, por meio da utilização do algoritmo NormFinder (ANDERSEN, JENSEN & ØRNTOFT, 2004), disponível em <http://www.mdl.dk/publicationsnormfinder.htm>. Este *software*

identifica o melhor gene normalizador entre um conjunto de candidatos, de acordo com a estabilidade de expressão dos mesmos. Após esta etapa, foi realizado o cálculo e a análise da expressão relativa dos genes estudados, utilizando-se o método  $2^{-\Delta\Delta CT}$  (LIVAK & SCHMITTGEN, 2001).

#### **4.4 Análise estatística**

Para o planejamento experimental descrito no item 4.2.4, a análise de regressão foi realizada através do software *Statistica*, versão 7.0 (*StatSoft*). Em relação aos resultados de expressão relativa obtidos por RT-qPCR, estes foram analisados através de cálculo estatístico *One-Way ANOVA* utilizando também o software *Statistica*, a um nível de significância de 5%.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Formação de biofilme

De acordo com um planejamento experimental em estrela, descrito no item 4.2.4, e utilizando-se a Metodologia de Superfície de Resposta, foram estudados os níveis de concentração de glicose e tempo de incubação, tendo como resposta a formação de biofilme pela cepa de *L. monocytogenes* denominada 55, do sorotipo 1/2a. Foram realizados 11 diferentes tratamentos, com concentrações de glicose adicionadas ao meio de cultivo TSB que variaram entre 0% e 1,8%, enquanto que o tempo de incubação aplicado variou entre 0,62 h e 51,38 h, em 3 diferentes temperaturas: 7°C, como exemplo de temperatura de refrigeração; 25°C, temperatura ambiente; e 37°C, temperatura ótima de crescimento do microrganismo.

De acordo com trabalhos realizados anteriormente (WIRTANEN & MATTILA-SANDHOLM, 1992; RATTI, 2006), a formação de biofilme foi considerada quando as contagens bacterianas indicaram números maiores ou iguais a 3log UFC/cm<sup>2</sup> de adesão nas superfícies de aço inoxidável. Logo, nas três diferentes temperaturas estudadas houve a formação de biofilme, com contagens que variaram entre 4,07 e 6,05log UFC/cm<sup>2</sup> para a temperatura de 7°C; 4,17 e 6,89log UFC/cm<sup>2</sup> para a temperatura de 25°C; e por fim, para a temperatura de 37°C, as contagens variaram entre 0 (não detectado) e 6,87log UFC/cm<sup>2</sup> (Tabela 4). Apesar de alguns estudos indicarem que isolados da linhagem I (incluindo os sorotipos 4b, 1/2b, 3c e 3b) produzem biofilmes mais densos que aqueles produzidos por isolados da linhagem II (incluindo os sorotipos 1/2a, 1/2c e 3a), outros trabalhos já demonstram resultados que confrontam um pouco essas afirmações. De acordo com Folsom, Siragusa e Frank (2006), cepas de *L. monocytogenes* do sorotipo 4b tiveram sua capacidade para formação de biofilme reduzida quando o nível de nutrientes no meio diminuiu, enquanto que o mesmo não foi observado para cepas do sorotipo 1/2a. No estudo realizado por Pan, Breidt e Gorski (2010) cepas do sorotipo 1/2a geralmente formaram biofilmes mais densos que cepas do sorotipo 4b sob uma variedade de condições, comprovando o bom potencial para formação de biofilme apresentado pelas cepas do mesmo sorotipo que a do presente trabalho. Em relação à adesão de

*L. monocytogenes* ao aço inoxidável em diferentes temperaturas, Chavant e colaboradores (2002) demonstraram valores de adesão bacteriana de *L. monocytogenes* de, pelo menos,  $10^7$  UFC/cm<sup>2</sup> após 2 horas de contato com o substrato, nas temperaturas de 8°C, 20°C e 37°C, sendo que a população inicial aderida aos corpos de prova de aço inoxidável AISI 304 foi maior na temperatura de 37°C. No trabalho realizado por Rieu e colaboradores (2008), cepas de *L. monocytogenes* cultivadas em meio TSB foram capazes de formar biofilmes sob corpos de prova de aço inoxidável AISI 304 quando incubadas a 25°C, em tempos que variaram entre 2 h e 48 h, sendo que a maior concentração de células sob a superfície de aço inoxidável foi verificada no maior tempo de incubação.

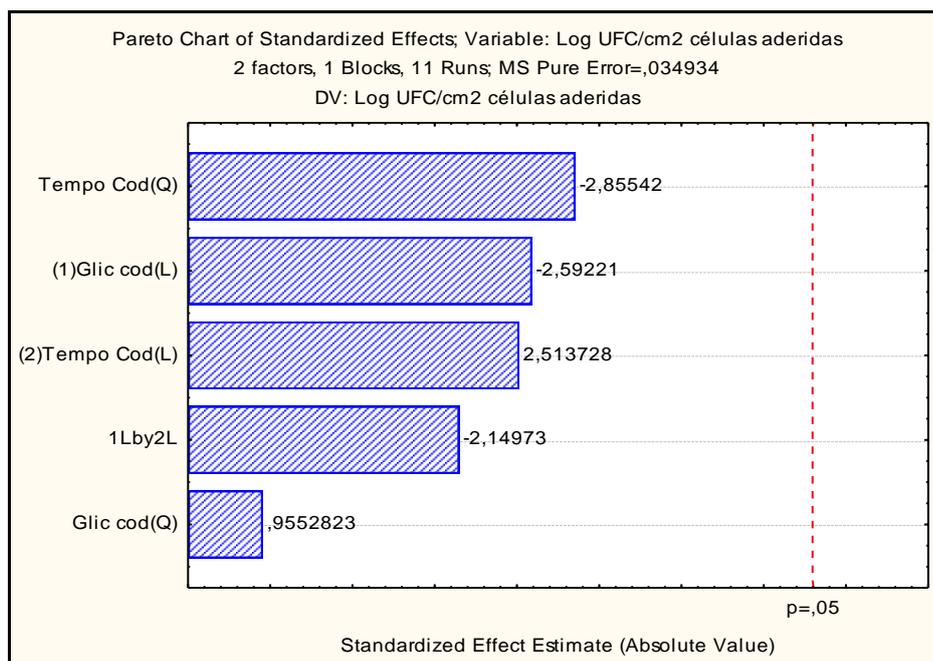
**Tabela 4:** Valores de adesão bacteriana (log UFC/cm<sup>2</sup>) ao aço inoxidável, nas temperaturas de 7°C, 25°C e 37°C.

Tratamento	Concentração de Glicose (%)	Tempo (h)	Adesão (log UFC/cm <sup>2</sup> ) a 7°C	Adesão (log UFC/cm <sup>2</sup> ) a 25°C	Adesão (log UFC/cm <sup>2</sup> ) a 37°C
1	0	8	6,05	5,57	6,87
2	1,5	8	5,05	6,18	6,51
3	0	44	5,70	6,87	6,87
4	1,5	44	5,09	5,70	0*
5	0	26	4,94	6,57	6,51
6	0,75	0,62	4,07	4,17	4,70
7	1,8	26	5,40	6,09	4,40
8	0,75	51,38	5,54	6,70	0*
9	0,75	26	5,56	6,24	5,79
10	0,75	26	5,57	6,89	4,94
11	0,75	26	5,24	6,18	4,87

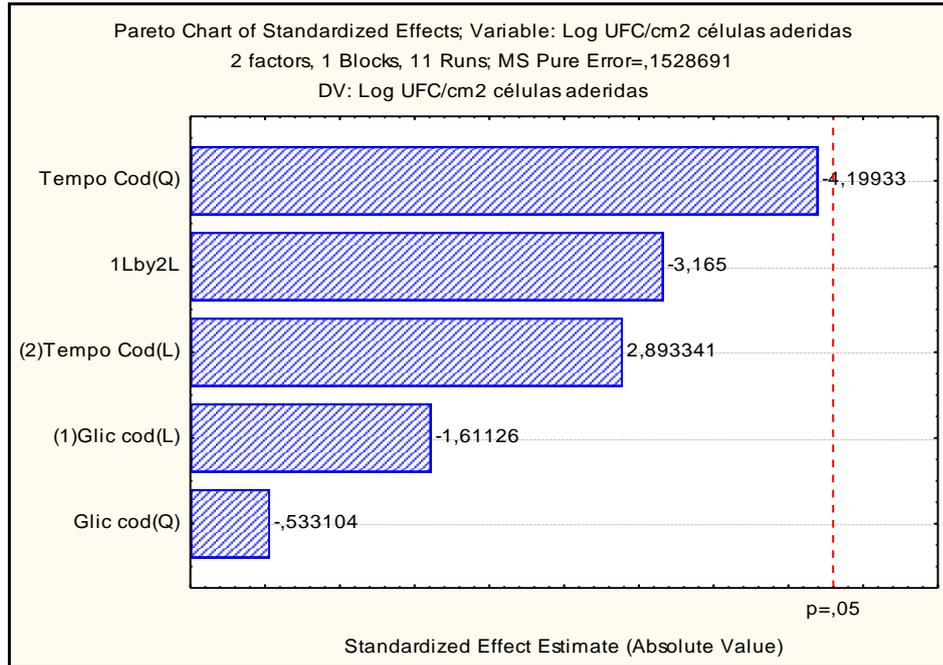
\*não detectado

## 5.2 Planejamento experimental

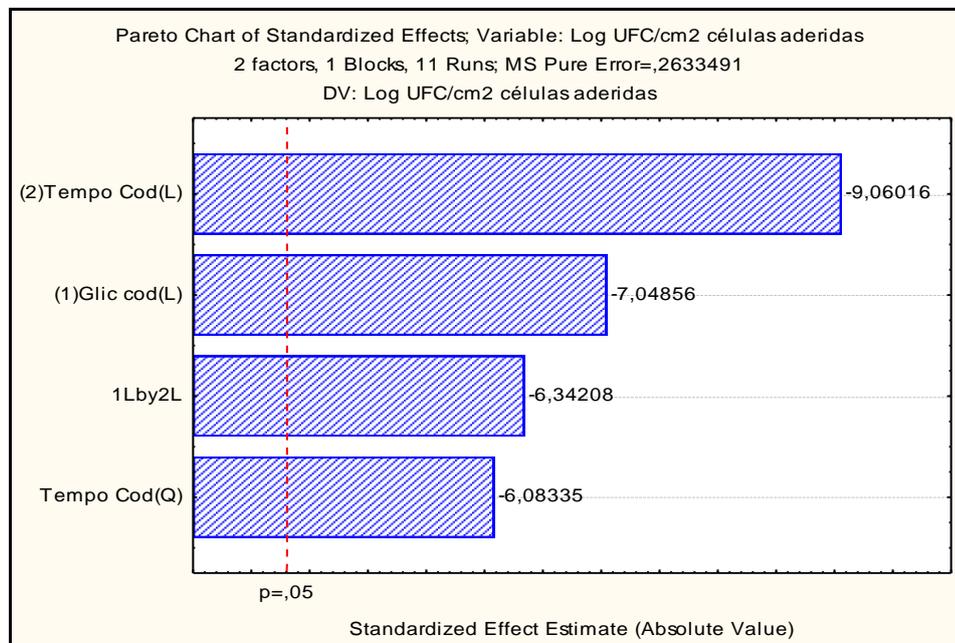
Apesar de ter havido adesão bacteriana considerável nas 3 diferentes temperaturas estudadas, os resultados demonstraram que as duas variáveis testadas no planejamento experimental, para os intervalos estudados, foram significativas ( $p < 0,05$ ) na formação de biofilme somente na temperatura de 37°C. As figuras 3, 4 e 5 abaixo representam os gráficos de Pareto das variáveis tempo de incubação e concentração de glicose na resposta formação de biofilme por *L. monocytogenes*, para as temperaturas de 7°C, 25°C e 37°C, respectivamente. Para o gráfico referente à temperatura de 37°C, os efeitos estatisticamente significativos estão indicados pela linha vertical.



**Figura 3:** Gráfico de Pareto das variáveis tempo de incubação e concentração de glicose na resposta formação de biofilme por *Listeria monocytogenes*, a 7°C.

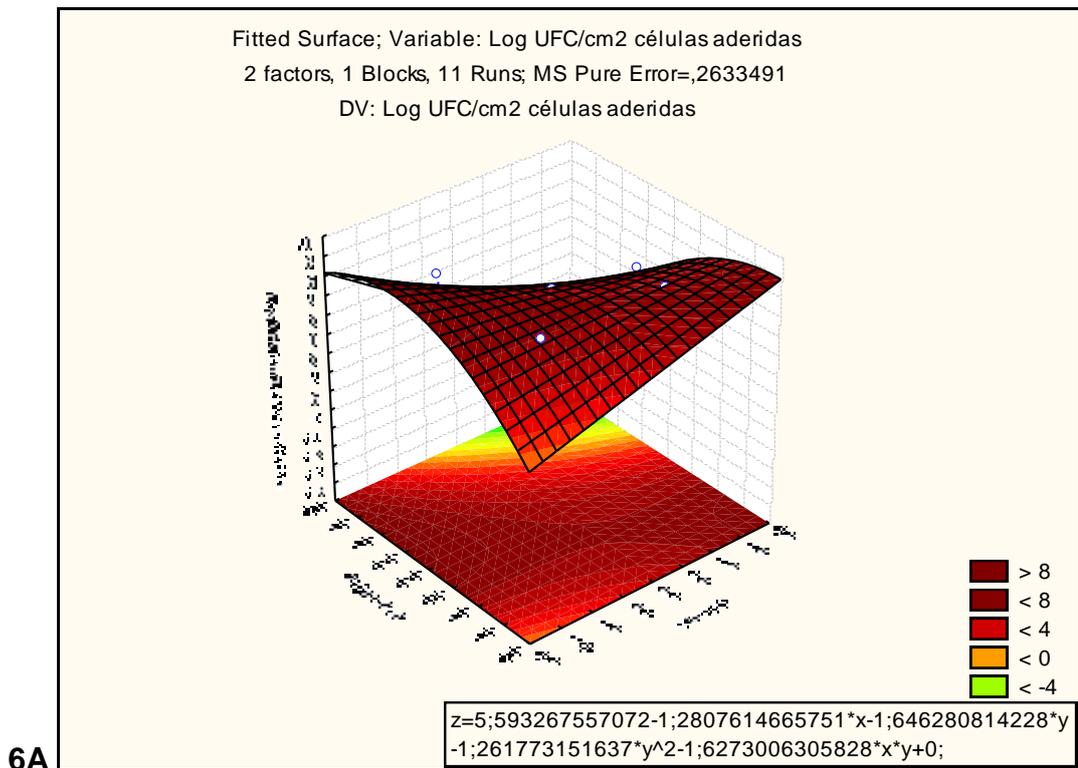


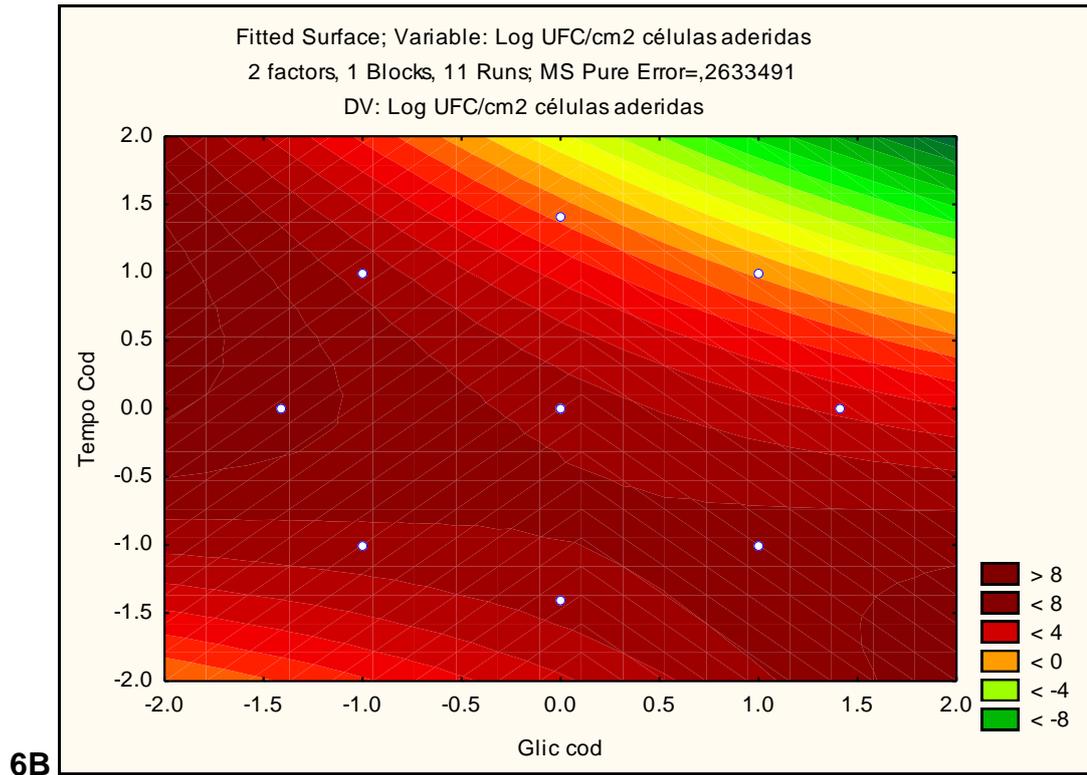
**Figura 4:** Gráfico de Pareto das variáveis tempo de incubação e concentração de glicose na resposta formação de biofilme por *Listeria monocytogenes*, a 25°C.



**Figura 5:** Gráfico de Pareto das variáveis tempo de incubação e concentração de glicose na resposta formação de biofilme por *Listeria monocytogenes*, a 37°C.

Como os fatores tempo de incubação e concentração de glicose interferem na resposta a 37°C, foi gerada uma superfície de resposta (Figuras 6A e 6B) e uma equação relacionada ao modelo proposto, válida para a faixa de valores estudados. Através da análise desta superfície de resposta observou-se que, a melhor condição para a formação de biofilme, dentro da faixa de estudo aplicada, foi em concentrações de glicose tendendo a zero combinadas com tempos de incubação próximos ao valor central de 26 h (região mais avermelhada da superfície de resposta). Também se obteve bons resultados para a formação de biofilme quando foram combinadas maiores concentrações de glicose com menores tempos de incubação. Importante ressaltar que a variável glicose quadrática foi retirada da equação, uma vez que não foi significativa no Pareto.





**Figuras 6A e 6B:** Formação de biofilme por *Listeria monocytogenes* a 37°C, observada como resposta da interação entre a concentração de glicose e o tempo de incubação.

Sabe-se que fatores ambientais, como temperatura, presença de nutrientes, pH, concentração de sal e açúcar, são importantes na adesão e formação de biofilmes microbianos. Além disso, *L. monocytogenes* é capaz de crescer e se multiplicar quando exposta a diferentes condições ambientais, devido a sua habilidade em utilizar uma variedade de carboidratos (STOLL & GOEBEL, 2010). Um estudo realizado anteriormente testou o crescimento de *L. monocytogenes* em meio TSB suplementado com glicose ou maltose, e os resultados demonstraram que o crescimento do microrganismo foi maior no meio de cultura suplementado com glicose. Além disso, quando foi comparado o seu crescimento na presença ou ausência de glicose no meio de cultura, a multiplicação foi mais acentuada quando o carboidrato estava presente (GOPAL *et al.*, 2010). Já foi relatado, inclusive, um aumento na sobrevivência do microrganismo na presença de glicose, quando este foi submetido a valores de pH baixo iguais a 3,5 (KOUTSOUMANIS, KENDALL & SOFOS, 2003). Em relação à formação de biofilme, em estudo anterior, estes se mostraram geralmente mais densos quando cepas de *L. monocytogenes* foram

incubadas em caldo Triptona de Soja adicionado de extrato de levedura (*TSB-YE - Triptone Soy Broth – Yeast Extract*) suplementado com glicose, principalmente quando formados a 37°C. Ao mesmo tempo, uma cepa do sorotipo 4b formou mais biofilme a 37°C, na ausência de glicose (PAN, BREIDT & GORSKI, 2010). Analisando os resultados do presente estudo, percebe-se que foi necessário menor tempo, na presença de glicose, para a formação de biofilme, enquanto que valores maiores de tempo foram necessários para a formação de biofilme, na ausência de glicose. Na formação de biofilme a 37°C, em dois dos tratamentos aplicados (1,5% de glicose/44 h de incubação; e 0,75% de glicose/51,38 h de incubação), a quantidade de células aderidas foi igual a 0log UFC/cm<sup>2</sup> (não detectado). Isto aconteceu nos maiores tempos de incubação e na presença de glicose, indicando que provavelmente ocorreu uma acelerada multiplicação celular do microrganismo na presença deste carboidrato, atingindo rapidamente a fase estacionária de seu desenvolvimento, com posterior declínio na multiplicação e ocorrência da morte celular, devido ao elevado tempo de incubação.

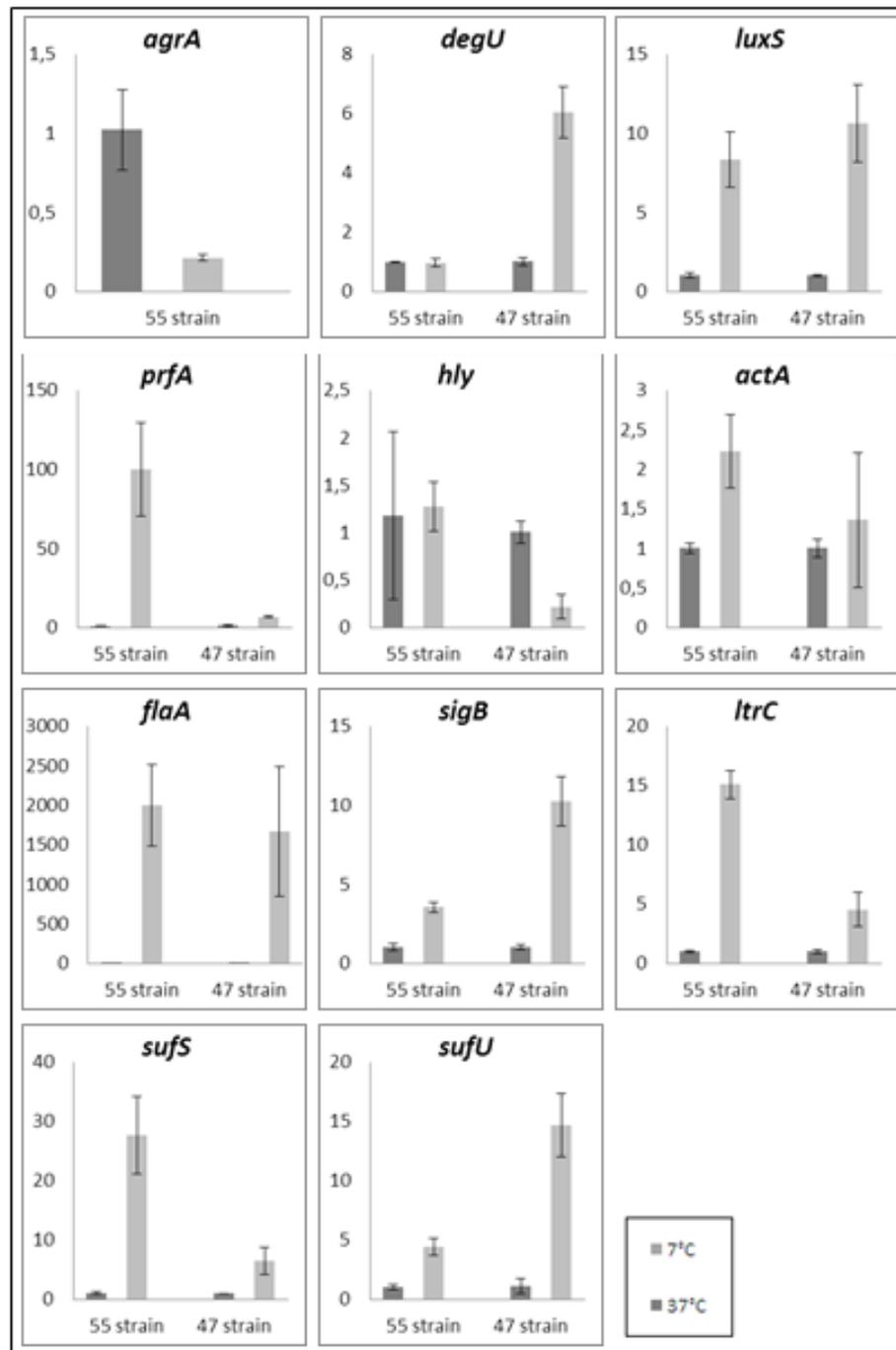
Analisando mais uma vez a superfície de resposta gerada, percebemos que, quanto maiores ou menores os valores de concentração de glicose e tempo de incubação, menor a resposta formação de biofilme (regiões que mais se afastam do tom avermelhado escuro, tendendo a cor verde). Logo, a combinação entre muita matéria orgânica e altos tempos de incubação não resulta em bons valores de adesão bacteriana, já que o microrganismo pode tender a morte celular, ao mesmo tempo que pouco tempo de incubação na ausência de glicose ou na presença de baixas concentrações deste carboidrato não é suficiente para uma adesão significativa. Importante destacar que as áreas da superfície de resposta que demonstram ter uma pior formação de biofilme, isto é, as que tendem a coloração verde, são bastante importantes para uma realidade industrial.

### **5.3 Análise transcricional**

Como já foi citado anteriormente, o isolamento do RNA de duas cepas de *L. monocytogenes*, cepa 55 (sorotipo 1/2a) e cepa 47 (sorotipo 4b), foi realizado pelo método CTAB, através de crescimento em caldo TSB nas temperaturas de 7°C (condição testada – temperatura de refrigeração) e 37°C (condição controle –

temperatura ótima de crescimento do microrganismo). A qualidade dos RNAs isolados foi verificada através de leitura em espectrofotômetro, e a razão [DO 260 nm/DO 280 nm] compreendeu valores entre 1,8 e 2,0 para todos, indicando baixo grau de contaminação com proteínas durante o processo. A partir dos RNAs isolados, os cDNAs foram sintetizados e então testados em reações de PCR convencional. Antes do início dos experimentos de RT-qPCR, os cDNAs foram diluídos e, através de uma curva de diluição que compreendeu concentrações de 1:25 a 1:100 (1:25; 1:50; 1:75; 1:100), foram testados utilizando-se todos os *primers* do presente estudo. A diluição 1:75 do cDNA foi a que apresentou maior eficiência frente aos experimentos de RT-qPCR, e dentre os genes constitutivos testados pelo software NormFinder, o gene *gap* foi o escolhido para a normalização dos dados, devido a baixa variação na expressão gênica e boa estabilidade apresentada (valor de estabilidade igual a 0,032).

Após a determinação do gene constitutivo a ser utilizado, foram realizados os experimentos de RT-qPCR, e os resultados de expressão relativa ( $2^{-\Delta\Delta C_T}$ ) se encontram na Figura 7. Através de análise de variância - fator único (*One-Way ANOVA*), foi verificado se houve diferença estatisticamente significativa, a um nível de significância de 5%, entre os valores de  $\Delta C_T$  crescimento a 7°C e  $\Delta C_T$  crescimento a 37°C ( $\Delta C_T$  = diferença entre o valor de  $C_T$  do gene estudado e o valor de  $C_T$  do gene constitutivo;  $C_T$  = “*threshold cycles*”, que corresponde ao número de ciclos onde a emissão de fluorescência devido aos amplicons excede o ponto de corte, denominado *threshold*), para as duas cepas e os onze genes estudados. Quando houve diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ), o gene foi considerado como sendo mais transcrito ( $2^{-\Delta\Delta C_T} > 1$ ) ou menos transcrito ( $2^{-\Delta\Delta C_T} < 1$ ) durante o crescimento a 7°C, em comparação ao crescimento a 37°C.



**Figura 7:** Expressão relativa dos genes *agrA*, *degU*, *luxS*, *prfA*, *hly*, *actA*, *flaA*, *sigB*, *ltrC*, *sufS* e *sufU* normalizada com o gene *gap*, para as cepas 55 (sorotipo 1/2a) e 47 (sorotipo 4b), a 7°C e 37°C, e seus respectivos valores de desvio padrão.

PrfA e Sigma B são importantes fatores de transcrição de *L. monocytogenes*, e ambos *prfA* e *sigB* apresentaram transcrição significativamente aumentada na condição de crescimento a 7°C, para as duas cepas ( $2^{-\Delta\Delta CT_{prfA/55}} = 100,02 \pm 29,70$ ;  $2^{-\Delta\Delta CT_{prfA/47}} = 6,58 \pm 0,69$ ;  $2^{-\Delta\Delta CT_{sigB/55}} = 3,54 \pm 0,30$ ;  $2^{-\Delta\Delta CT_{sigB/47}} = 10,24 \pm 1,53$ ). Como já foi citado anteriormente, além da regulação de genes de resposta ao estresse, a transcrição de diversos genes de virulência, incluindo o *prfA*, é controlada também pelo fator de transcrição Sigma B. Baixas temperaturas são estresses adicionais para *L. monocytogenes* nos ambientes processadores de alimentos que induzem a atividade do fator Sigma B (BECKER *et al.*, 2000), e isso foi demonstrado no presente trabalho. Diversos estudos indicam que o PrfA e outros genes de virulência controlados por este fator de transcrição, como *hly*, *mpl*, *plcA*, *plcB* e *actA* (OLLINGER *et al.*, 2009) são mais transcritos a 37°C, temperatura ótima para o crescimento de *L. monocytogenes* (JOHANSSON *et al.*, 2002), porém, *prfA* pode ser transcrito a baixas temperaturas, e o fator de transcrição PrfA pode alternar entre sua forma ativa e inativa, dependendo da temperatura de crescimento (RENZONI *et al.*, 1997). Complementando esta informação, Sigma B e PrfA são expressos em resposta a condições do ambiente, e as suas atividades podem ser influenciadas por diferentes condições de pH, temperatura e fase de crescimento da bactéria, como no caso do PrfA (LARSEN, LEISNER & INGMER, 2010). Ao mesmo tempo, é importante destacar que a adaptação a ambientes fora do hospedeiro tende a aumentar a virulência de *L. monocytogenes* e de outros patógenos, devido a várias condições de estresse que o organismo pode ter que enfrentar em tais situações.

A transcrição do gene *hly*, essencial para a virulência de *L. monocytogenes*, não variou significativamente entre as duas temperaturas, demonstrando que o gene foi igualmente transcrito a 7°C e 37°C para as duas cepas testadas ( $2^{-\Delta\Delta CT_{hly/55}} = 1,27 \pm 0,26$ ;  $2^{-\Delta\Delta CT_{hly/47}} = 0,22 \pm 0,13$ ) e indicando a manutenção da patogenicidade do microrganismo em temperaturas de refrigeração. Um estudo recente (BEN SLAMA *et al.*, 2013) analisou os níveis de transcrição de quatro genes de virulência (*hlyA*, *iap*, *fri* and *flaA*) por PCR quantitativo em tempo real, após a incubação por 6 meses a -20°C de fatias de um queijo artesanal inoculado com cepas de *L. monocytogenes*. Os resultados demonstraram que todos os genes estudados foram transcritos após o tempo de incubação, sendo que os níveis de transcrição foram afetados pelo congelamento, e a taxa de transcrição do gene *hlyA* foi ligeiramente menor em comparação aos demais genes. Outro estudo (LARSEN, KOCH &

INGMER, 2010) investigou como várias condições de crescimento podem influenciar a virulência de *L. monocytogenes*, através da sua habilidade em invadir linhas de células epiteliais Caco-2 e INT-407, e os resultados indicaram que *L. monocytogenes* pôde invadir as células Caco-2 mesmo após 4 semanas de estocagem em temperatura refrigerada.

Em relação ao gene *actA*, responsável pela formação das caudas de actina, que facilitam o movimento intracelular e a propagação do microrganismo para as células vizinhas, disseminando o processo infeccioso, a sua transcrição não variou significativamente entre as condições de crescimento a 7°C e 37°C para a cepa 47 ( $2^{-\Delta\Delta CT_{actA/47}} = 1,36 \pm 0,85$ ), porém, para a cepa 55, este gene foi mais transcrito a 7°C ( $2^{-\Delta\Delta CT_{actA/55}} = 2,23 \pm 0,47$ ), concordando com o resultado obtido para o gene *prfA*, que controla a transcrição de diversos genes de virulência de *L. monocytogenes*, incluindo o gene *actA*.

Em *L. monocytogenes* são encontrados diversos sistemas de dois componentes (TCSs = *Two-Component Systems*), incluindo VirR, CheY e DegU, um importante regulador que tem sido bastante associado com a termotolerância, virulência, formação de biofilme e motilidade (GUERIRI *et al.*, 2008). Para a cepa 55, o gene *degU* foi igualmente transcrito nas duas temperaturas estudadas ( $2^{-\Delta\Delta CT_{degU/55}} = 0,97 \pm 0,14$ ), enquanto que para a cepa 47 esse gene foi mais transcrito a 7°C ( $2^{-\Delta\Delta CT_{degU/47}} = 6,04 \pm 0,87$ ). Este resultado, principalmente para a cepa 47, está de acordo com o que foi observado para os genes *prfA* e *sigB*, envolvidos na regulação de genes de resposta ao estresse e de virulência, já que estes também foram mais transcritos a 7°C, indicando dessa forma o envolvimento de DegU em mecanismos fundamentais para a patogenicidade, resistência e persistência de *L. monocytogenes* nos ambientes. DegU já foi também identificado como um ativador positivo da biossíntese do flagelo, o qual não é expresso a 37°C (WILLIAMS *et al.*, 2005). A baixas temperaturas, esta proteína ativa a transcrição do gene *gmaR*, o qual codifica a proteína GmaR, um ativador transcricional do gene *flaA*, responsável pela síntese do flagelo e motilidade (MURRAY, KILEY & STANLEY-WALL, 2009). No presente estudo, o gene *flaA* apresentou maiores níveis de transcrição a 7°C, para ambas as cepas ( $2^{-\Delta\Delta CT_{flaA/55}} = 1999,72 \pm 512,13$ ;  $2^{-\Delta\Delta CT_{flaA/47}} = 1668,11 \pm 823,33$ ), demonstrando quase nenhuma transcrição do gene a 37°C. De acordo com Kamp e Higgins (2011), ao entrar no hospedeiro, *L. monocytogenes* reprime a transcrição dos genes flagelares em resposta a temperatura fisiológica dos mamíferos de 37°C,

sendo esta regulação negativa da motilidade flagelar necessária para a virulência da bactéria.

O desenvolvimento e a maturação de um biofilme requerem mecanismos moleculares complexos, nos quais a comunicação entre as células está envolvida e, no caso da *L. monocytogenes*, o sistema *agr* desempenha um papel importante durante os primeiros estágios da formação de biofilme. Interessantemente, a presença do gene *agrA* não foi detectada na cepa 47, enquanto que para a cepa 55, este gene foi significativamente menos transcrito a 7°C ( $2^{-\Delta\Delta CT_{agrA/55}} = 0,21 \pm 0,02$ ).

Alguns trabalhos mostram que a deleção do gene *agrA* afeta a adesão de *L. monocytogenes* a superfícies abióticas, e também indicam o envolvimento do sistema *agr* durante o início da formação de biofilme, mas não ao longo das etapas posteriores de seu desenvolvimento (RIEU *et al.*, 2008). Assim, a ausência de transcrição do gene *agrA* pode reduzir a adesão inicial de *L. monocytogenes* a diversas superfícies, mas não o suficiente para afetar diretamente a formação de biofilme subsequente. Estudos anteriores (BORUCKI *et al.*, 2003; HARVEY, KEENAN & GILMOUR, 2007) detectaram diferenças significativas entre a formação de biofilme por cepas de *L. monocytogenes* de diferentes sorotipos, demonstrando uma melhor formação de biofilme por cepas da linhagem II (sorotipos 1/2a e 1/2c) em comparação a cepas da linhagem I (sorotipos 1/2b e 4b), e isto está de acordo com Folsom, Siragusa e Frank (2006), os quais demonstraram que cepas do sorotipo 1/2a e 4b diferem no desenvolvimento de biofilmes. Previamente já foi relatado também que a deleção do gene *agrA* diminui a transcrição de genes controlados pelos fatores PrfA e Sigma B, reduzindo a habilidade de *L. monocytogenes* em gerar um processo infeccioso, enquanto que ao mesmo tempo aumenta as taxas de crescimento de células planctônicas a 37°C, resultando na formação de biofilme nesta temperatura (GARMYN *et al.*, 2012). Este mesmo estudo demonstrou também a transcrição aumentada de 39 reguladores, incluindo o gene *agrA*, com o aumento da temperatura.

Outro gene analisado foi o *luxS*, uma vez que são poucos os trabalhos que vêm desenvolvendo pesquisas relacionadas a presença do mesmo em *L. monocytogenes*. Existe uma certa inconsistência na literatura em relação a influência deste gene no desenvolvimento dos biofilmes (DAINES *et al.*, 2005; McNAB *et al.*, 2003), mas têm sido também relatado que a sua presença pode influenciar negativamente a formação de biofilme (SELA *et al.*, 2006). Para ambas as cepas

estudadas, o gene *luxS* mostrou maiores níveis de transcrição a 7°C ( $2^{-\Delta\Delta CT_{luxS/55}} = 8,34 \pm 1,75$ ;  $2^{-\Delta\Delta CT_{luxS/47}} = 10,62 \pm 2,47$ ), e esse resultado é exatamente o contrário do que foi observado para o gene *agrA*, o qual influencia positivamente a formação de biofilme por *L. monocytogenes*.

Baixas temperaturas são amplamente utilizadas e aplicadas em indústrias de alimentos, e sendo *L. monocytogenes* um microrganismo psicrotrófico, sua presença e multiplicação torna-se uma grande preocupação para tais estabelecimentos, desde que o crescimento em temperaturas de congelamento ou refrigeração constitui a principal ameaça de infecção de origem alimentar por bactérias do gênero *Listeria* (SHIN, BRODY & PRICE, 2010). O gene *ltrC*, gene de resposta ao estresse envolvido no crescimento e adaptação de *L. monocytogenes* a baixas temperaturas (CHAN, BOOR & WIEDMANN, 2007), foi significativamente mais transcrito a 7°C, para ambas as cepas ( $2^{-\Delta\Delta CT_{ltrC/55}} = 15,07 \pm 1,20$ ;  $2^{-\Delta\Delta CT_{ltrC/47}} = 4,54 \pm 1,41$ ), comportamento que foi igualmente observado para o gene *sigB*. De acordo com Chan, Boor e Wiedmann (2007), alguns genes regulados pelo fator Sigma B demonstraram estar envolvidos na adaptação de *L. monocytogenes* a baixas temperaturas, incluindo o gene *ltrC*, cuja transcrição demonstrou ser Sigma B-dependente a 4°C. Neste mesmo estudo, os níveis de transcrição do gene *ltrC* de uma cepa de *L. monocytogenes*, sorotipo 1/2a, foram maiores que os níveis de transcrição de uma cepa mutante  $\Delta sigB$ .

E a respeito dos genes *sufS* e *sufU*, envolvidos na formação dos centros de Ferro-Enxofre, pôde ser observado que ambos os genes foram mais transcritos a 7°C, tanto para a cepa 55 quanto para a cepa 47 ( $2^{-\Delta\Delta CT_{sufS/55}} = 27,64 \pm 6,49$ ;  $2^{-\Delta\Delta CT_{sufS/47}} = 6,44 \pm 2,31$ ;  $2^{-\Delta\Delta CT_{sufU/55}} = 4,42 \pm 0,73$ ;  $2^{-\Delta\Delta CT_{sufU/47}} = 14,67 \pm 2,68$ ).

## 6. CONCLUSÕES

A partir da execução de um planejamento experimental em estrela, verificou-se que tanto concentrações de glicose tendendo a zero combinadas com tempos de incubação próximos ao valor central de 26 h, como maiores concentrações de glicose combinadas com menores tempos de incubação, representaram boas condições para a formação de biofilme por uma cepa de *L. monocytogenes*, sorotipo 1/2a, na temperatura de 37°C. Analisando-se estes resultados, fica claro perceber que quanto maior a quantidade de matéria orgânica, menor o tempo necessário para que o microrganismo consiga se aderir às superfícies “contaminadas”. Além disso, a superfície de resposta gerada demonstrou que quanto maior ou menor a concentração de glicose e o tempo de incubação, pior a formação de biofilme pela cepa estudada, sendo essa uma informação importante tanto para indústrias de alimentos quanto para serviços de alimentação, mas sempre ressaltando que os resultados de um planejamento experimental valem somente para uma faixa de estudo específica e determinada.

Em relação à análise transcricional, a maioria dos genes estudados foi mais transcrito a 7°C, em comparação aos seus níveis de transcrição a 37°C, temperatura ótima para o crescimento de *L. monocytogenes*. Estes resultados demonstram a capacidade do microrganismo em ativar diversos mecanismos quando sob condições de estresse, para que o mesmo possa se manter viável e patogênico inclusive nessas situações. Além disso, os resultados reforçam a importância de se controlar a presença de *L. monocytogenes* em estabelecimentos que utilizam amplamente a cadeia de frio, como laticínios e indústrias de alimentos prontos para consumo.

Também é interessante notar que os dois sorotipos estudados, responsáveis por muitos dos casos humanos de listeriose, apresentaram diferentes mecanismos moleculares, nas temperaturas de 7°C e 37°C, indicando dessa forma a necessidade de, futuramente, serem realizados mais experimentos com outros genes relevantes de *L. monocytogenes*.

## 7. PERSPECTIVAS

Algumas das perspectivas, para a realização de pesquisas futuras, são:

- 1) Análise transcricional dos genes estudados nas cepas do presente trabalho crescidas em temperatura ambiente de 25°C (RNAs já extraídos e cDNAs sintetizados);
- 2) Análise transcricional de outros importantes genes relacionados à formação de biofilme, virulência e resposta ao estresse em *L. monocytogenes*, citados ao longo do desenvolvimento bibliográfico deste trabalho, em cepas de diferentes sorotipos;
- 3) Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) de biofilmes formados sobre corpos de prova de AISI 316 em boas e ruins condições para sua formação, de acordo com resultados obtidos pelo planejamento experimental aplicado neste estudo;
- 4) Dar continuidade a experimentos iniciados durante a realização do mestrado, de formação de biofilme em aço inoxidável por cepas de *L. monocytogenes* de diferentes sorotipos, em boas condições para sua formação, indicadas pelo planejamento experimental aplicado neste estudo.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALESSANDRIA, V. et al. Molecular methods to assess *Listeria monocytogenes* route of contamination in a dairy processing plant. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 141, suplemento 1, p. S156-S162, julho 2010.

ANDERSEN, C. L.; JENSEN, J. L.; ØRNTTOFT, T. F. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. **Cancer research**, v. 64, n. 15, p. 5245-5250, agosto 2004.

BECKER, L. A. et al. Role of sigma(B) in adaption of *Listeria monocytogenes* to growth at low temperature. **Journal of Bacteriology**, Washington, D. C., v. 182, n. 24, p. 7083-7087, dezembro 2000.

BEN SLAMA, R. et al. Survival of *Listeria monocytogenes* cells and the effect of extended frozen storage (-20 °C) on the expression of its virulence gene. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, doi 10.1007/s12010-013-0253-8, maio 2013.

BITAR, A. P.; CAO, M.; MARQUIS, H. The metalloprotease of *Listeria monocytogenes* is activated by intramolecular autocatalysis. **Journal of Bacteriology**, Washington, D. C., v. 190, n. 1, p. 107-111, janeiro 2008.

BITOUN, J. P. et al. Transcriptional repressor Rex is involved in regulation of oxidative stress response and biofilm formation by *Streptococcus mutans*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 320, n. 2, p. 110-117, julho 2011.

BOLES, B. R.; SINGH, P. K. Endogenous oxidative stress produces diversity and adaptability in biofilm communities. **Proceeding of the National Academic of Sciences U. S. A.**, v. 105, n. 34, p. 12503-12508, agosto 2008.

BONAZZI, M.; LECUIT, M.; COSSART, P. *Listeria monocytogenes* internalin and E-cadherin: from bench to bedside. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 1, n. 4, a003087, outubro 2009.

BORUCKI, M. K. et al. Variation in biofilm formation among strains of *Listeria monocytogenes*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, D. C., v. 69, n. 12, p. 7336-7342, dezembro 2003.

CHAN, Y. C.; BOOR, K. J.; WIEDMANN, M. SigmaB-dependent and SigmaB-independent mechanisms contribute to transcription of *Listeria monocytogenes* cold stress genes during cold shock and cold growth. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, D. C., v. 73, n. 19, p. 6019-6029, outubro 2007.

CHATURONGAKUL, S.; BOOR, K. J. SigmaB activation under environmental and energy stress conditions in *Listeria monocytogenes*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, D. C., v. 72, n. 8, p. 5197-5203, agosto 2006.

CHAVANT, P. et al. *Listeria monocytogenes* LO28: surface physicochemical properties and ability to form biofilms at different temperatures and growth phases. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, D. C., v. 68, n. 2, p. 728-737, fevereiro 2002.

COTTER, P. D.; GAHAN, C. G. M.; HILL, C. A glutamate decarboxylase system protects *Listeria monocytogenes* in gastric fluid. **Molecular Microbiology**, v. 40, n. 2, p. 465–475, abril 2001.

CUCARELLA, C. et al. Bap, a *Staphylococcus aureus* surface protein involved in biofilm formation. **Journal of Bacteriology**, Washington D. C.; v. 183, n. 9, p. 2888-2896, maio 2001.

CUCARELLA, C. et al. Role of biofilm-associated protein *bap* in the pathogenesis of bovine *Staphylococcus aureus*. **Infection and Immunity**, Washington, D. C., v. 72, n. 4, p. 2177-2185, abril 2004.

DAINES, D. A. et al. *Haemophilus influenzae luxS* mutants form a biofilm and have increased virulence. **Microbial pathogenesis**, v. 39, p. 87-89, 2005.

DONS, L. et al. Role of flagellin and the Two-Component CheA/CheY System of *Listeria monocytogenes* in host cell invasion and virulence. **Infection and Immunity**, Washington, D. C., v. 72, n. 6, p. 3237-3244, junho 2004.

DONS, L.; OLSEN, J. E.; RASMUSSEN, O. F. Characterization of two putative *Listeria monocytogenes* genes encoding polypeptides homologous to the sensor protein CheA and the response regulator CheY of chemotaxis. **DNA Sequence**, v. 4, n. 5, p. 301–311, 1994

DOUMITH, M. et al. Differentiation of the major *Listeria monocytogenes* serovars by Multiplex PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, D. C., v. 42, n. 8, p. 3819–3822, agosto 2004.

DRÖGE, W. Oxidative stress and aging. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 543, p. 192-200, 2003.

FOLSOM, J. P.; SIRAGUSA, G. R.; FRANK, J. F. Formation of biofilm at different nutrient levels by various genotypes of *Listeria monocytogenes*. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 69, p. 826-834, 2006.

FORSYTHE, S. J. **The Microbiology of Safe Food**. 2nd. ed. Chichester: Wiley-Blackwell, 2010. 496p.

FRANK, J. F. Microbial attachment to food and food contact surfaces. **Advances in Food and Nutrition Research**, Lincoln, v. 43, p. 319-370, 2001.

FRECE, J. et al. Comparison of conventional and molecular methods for the routine confirmation of *Listeria monocytogenes* in milk products produced domestically in Croatia. **Journal of Dairy Research**, London, v. 77, n. 1, p. 112-116, fevereiro 2010.

GAILLARD, J. -L. et al. Entry of *L. monocytogenes* into cells is mediated by internalin, a repeat protein reminiscent of surface antigens from Gram-positive cocci. **Cell**, Cambridge, v. 65, n. 7, p. 1127-1141, junho 1991.

GANDHI, M.; CHIKINDAS, M. L. *Listeria*: a foodborne pathogen that knows how to survive. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 113, n. 1, p. 1-15, janeiro 2007.

GARCÍA-DEL PORTILLO, F. et al. Association of ActA to peptidoglycan revealed by cell wall proteomics of intracellular *Listeria monocytogenes*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 40, p. 34675-34689, outubro 2011.

GARDAN, R. et al. Role of *ctc* from *Listeria monocytogenes* in osmotolerance. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, D.C., v. 69, n. 1, p. 154-161, janeiro 2003.

GARMYN, D. et al. Communication and autoinduction in the species *Listeria monocytogenes*: A central role for the *agr* system. **Communicative and Integrative Biology**, Austin, v. 2, n. 4, p. 371-374, julho/agosto 2009.

GARMYN, D. et al. *Listeria monocytogenes* differential transcriptome analysis reveals temperature-dependent Agr regulation and suggests overlaps with other regulons. **PLoS One**, v. 7, n. 9, e43154, 2012.

GHANEM, E. N. B. et al. InIA promotes dissemination of *Listeria monocytogenes* to the mesenteric lymph nodes during foodborne infection of mice. **PLoS Pathogens**, v. 8, n. 11, e1003015, novembro 2012.

GLASER, P. et al. Comparative genomics of *Listeria* species. **Science**, v. 294, n. 5543, p. 849–852, outubro 2001.

GOPAL, S. et al. Maltose and maltodextrin utilization by *Listeria monocytogenes* depend on an inducible ABC transporter which is repressed by glucose. **PLoS One**, v. 5, n. 4, e10349, abril 2010.

GUERIRI, I. et al. The DegU orphan response regulator of *Listeria monocytogenes* autorepresses its own synthesis and is required for bacterial motility, virulence and biofilm formation. **Microbiology**, v. 154, n. 8, p. 2251-2264, agosto 2008.

HABIMANA, O. et al. Genetic features of resident biofilms determine attachment of *Listeria monocytogenes*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, D.C., v. 75, n. 24, p. 7814-7821, dezembro 2009.

HAIN, T. et al. Comparative genomics and transcriptomics of lineages I, II, and III strains of *Listeria monocytogenes*. **BMC Genomics**, v. 13, doi: 10.1186/1471-2164-13-144 (publicação online em 24 de abril de 2012).

HARVEY, J.; KEENAN, K. P.; GILMOUR, A. Assessing biofilm formation by *Listeria monocytogenes* strains. **Food Microbiology**, v. 24, n. 4, p. 380-392, junho 2007.

HOFER, E.; DOS REIS, C. M. F.; HOFER, C. B. Sorovares de *Listeria monocytogenes* e espécies relacionadas, isoladas de material clínico humano. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 39, n. 1, p. 32-37, janeiro/fevereiro 2006.

JAY, J. M. **Microbiologia de Alimentos**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 711p.

JEMMI, T.; STEPHAN, R. *Listeria monocytogenes*: food-borne pathogen and hygiene indicator. **Révue Scientifique et Technique — Office International des Epizooties**, Paris, v. 25, n. 2, p. 571-580, 2006.

JOHANSSON, J. et al. An RNA thermosensor controls expression of virulence genes in *Listeria monocytogenes*. **Cell**, v. 110, n. 5, p. 551-561, setembro 2002.

JORDAN, S. J. et al. *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**, Washington D. C., v. 74, n. 17, p. 5451-5456, setembro 2008.

KAMP, H. D.; HIGGINS, D. E. A protein thermometer controls temperature-dependent transcription of flagellar motility genes in *Listeria monocytogenes*. **PLoS Pathogens**, v. 7, n. 8, e1002153, agosto 2011.

KATHARIOU, S. *Listeria monocytogenes* virulence and pathogenicity, a food safety perspective. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 65, n. 11, p. 1811-1829, novembro 2002.

KHELEF, N.; LECUIT, M.; BUCHRIESER, C.; CABANES, D.; DUSSURGET, O.; COSSART, P. *Listeria monocytogenes* and the genus *Listeria*. In: DWORKIN, M.; FALKOW, S.; ROSENBERG, E.; SCHLEIFER, K.-H.; STACKEBRANDT, E. **The Prokaryotes: A handbook on the biology of bacteria**. 3rd. ed. New York: Springer, 2006. Cap. 1.2.11, p. 404-476.

KNUDSEN, G. M.; OLSEN, J. E.; DONS, L. Characterization of DegU, a response regulator in *Listeria monocytogenes*, involved in regulation of motility and contributes to virulence. **FEMS Microbiology Letters**, v. 240, n. 2, p. 171-179, novembro 2004.

KOUTSOUMANIS, K. P.; KENDALL, P. A.; SOFOS, J. N. Effect of food processing-related stresses on acid tolerance of *Listeria monocytogenes*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, D. C., v. 69, n. 12, p. 7514-7516, dezembro 2003.

LARSEN, M. H.; KOCH, A. G.; INGMER, H. *Listeria monocytogenes* efficiently invades Caco-2 cells after low-temperature storage in broth and on deli meat. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 7, n. 9, p. 1013-1018, setembro 2010

LARSEN, M. H.; LEISNER, J. J.; INGMER, H. The chitinolytic activity of *Listeria monocytogenes* EGD is regulated by carbohydrates but also by the virulence regulator PrfA. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, D. C., v. 76, n. 19, p. 6470-6476, outubro 2010.

LASA, I. Towards the identification of the common features of bacterial biofilm development. **International Microbiology**, Barcelona, v. 9, n. 1, p. 21–28, março 2006.

LEMON, K. P.; FREITAG, N. E.; KOLTER, R. The virulence regulator PrfA promotes biofilm formation by *Listeria monocytogenes*. **Journal of Bacteriology**, Washington, D. C., v. 192, n. 15, p. 3969-3976, agosto 2010.

LEMON, K. P.; HIGGINS, D. E.; KOLTER, R. Flagellar motility is critical for *Listeria monocytogenes* biofilm formation. **Journal of Bacteriology**, Washington, D. C., v. 189, n. 12, p. 4418-4424, junho 2007.

LE MONNIER, A. et al. Diagnosis of *Listeria monocytogenes* Meningoencephalitis by Real-Time PCR for the *hly* Gene. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, D. C., v. 49, n. 11, p. 3917- 3923, novembro 2011.

LIU, D. Identification, subtyping and virulence determination of *Listeria monocytogenes*, an important foodborne pathogen. **Journal of Medical Microbiology**, v. 55, n. 6, p. 645–659, junho 2006.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402-408, dezembro 2001.

LYON, G. J.; NOVICK, R. P. Peptide signaling in *Staphylococcus aureus* and other Gram-positive bacteria. **Peptides**, v. 25, n. 9, p. 1389-1403, setembro 2004.

MCLAUHLIN, J. et al. *Listeria monocytogenes* and listeriosis: a review of hazard characterization for use in microbiological risk assessment of foods. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 92, n. 1, p. 15-33, abril 2004.

McNAB, R. et al. LuxS-based signaling in *Streptococcus gordonii*: autoinducer 2 controls carbohydrate metabolism and biofilm formation with *Porphyromonas gingivalis*. **Journal of Bacteriology**, Washington, D. C., v. 185, p. 274-284, 2003.

MONTVILLE, T.J.; MATTHEWS, K.R. **Food Microbiology: An Introduction**. 2nd. ed. Washington, D.C.: ASM Press, 2008. 428p.

MORETRO, T.; LANGSRUD, S. *Listeria monocytogenes*: biofilm formation and persistence in food-processing environments. **Biofilms**, v. 1, p. 107–121, 2004.

MURRAY, E. J.; KILEY, T. B.; STANLEY-WALL, N. R. A pivotal role for the response regulator DegU in controlling multicellular behavior. **Microbiology**, v. 155, p. 1-8, 2009.

NEALSON, K. H.; PLATT, T.; HASTINGS, J. W. Cellular control of the synthesis and activity of the bacterial luminescent system. **Journal of Bacteriology**, Washington, D. C., v. 104, n. 1, p. 313-322, outubro 1970.

NIGHTINGALE, K. K.; WINDHAM, K.; WIEDMANN, M. Evolution and molecular phylogeny of *Listeria monocytogenes* isolated from human and animal listeriosis cases and foods. **Journal of Bacteriology**, Washington, D. C., v. 187, n. 16, p. 5537-5551, agosto 2005.

OLLINGER, J. et al. *Listeria monocytogenes* SigmaB modulates PrfA-mediated virulence factor expression. **Infection and Immunity**, Washington, D. C., v. 77, n. 5, p. 2113-2124, maio 2009.

PAN, Y.; BREIDT, F. Jr.; GORSKI, L. Synergistic effect of sodium chloride, glucose, and temperature on biofilm formation by *Listeria monocytogenes* serotype 1/2a and 4b strains. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, D. C., v. 76, n. 5, p. 1433–1441, março 2010.

PILGRIM, S. et al. Deletion of the gene encoding p60 in *Listeria monocytogenes* leads to abnormal cell division and loss of actin-based motility. **Infection and Immunity**, Washington, D. C., v. 71, n. 6, p. 3473-3484, junho 2003.

PORTNOY, D. A. et al. Molecular determinants of *Listeria monocytogenes* pathogenesis. **Infection and Immunity**, Washington, D. C., v. 60, n. 4, p. 1263-1267, abril 1992.

POUSSIN, M. A.; GOLDFINE, H. Evidence for involvement of ActA in maturation of the *Listeria monocytogenes* phagosome. **Cell Research**, v. 20, n. 1, p. 109-112, janeiro 2010.

PURKRTOVA, S. et al. Resistance of *Listeria monocytogenes* biofilms to disinfectants. **Czech Journal of Food Science**, Praga, v. 28, n. 4, p. 326-332, 2010.

RAENGPRADUB, S.; WIEDMANN, M.; BOOR, K. J. Comparative analysis of the SigmaB-dependent stress responses in *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* strains exposed to selected stress conditions. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, D.C., v. 74, n. 1, p. 158-171, janeiro 2008.

RATTI, R.P. ***Listeria mmonocytogenes* em alimentos fatiados e equipamentos; Ocorrência, formação de biofilme e controle.** Dissertação de Mestrado, Biciências, Ribeirão Preto, USP, p.96, 2006

REICHERT-SCHWILLINSKY, F. et al. Stress- and growth rate-related differences between plate count and real-time PCR data during growth of *Listeria monocytogenes*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, D.C., v. 75, n. 7, p. 2132-2138, abril 2009.

RENZONI, A. et al. Evidence that PrfA, the pleiotropic activator of virulence genes in *Listeria monocytogenes*, can be present but inactive. **Infection and Immunity**, Washington, D. C., v. 65, p. 1515-1518, 1997.

RIEDEL, C. U. et al. AgrD-dependent quorum sensing affects biofilm formation, invasion, virulence and global gene expression profiles in *Listeria monocytogenes*. **Molecular Microbiology**, v. 71, n. 5, p. 1177-1189, janeiro 2009.

RIEU, A. et al. *agr* System of *Listeria monocytogenes* EGD-e: role in adherence and differential expression pattern. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, D. C., v. 73, n. 19, p. 6125-6133, outubro 2007.

RIEU, A. et al. *Listeria monocytogenes* EGD-e Biofilms: No Mushrooms but a Network of Knitted Chains. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, D. C., v. 74, n. 14, p. 4491-4497, julho 2008.

ROBERTS, A. J.; WIEDMANN, M. Pathogen, host and environmental factors contributing to the pathogenesis of listeriosis. **Cellular and Molecular Life Sciences**, Basel, v. 60, n. 5, p. 904-918, maio 2003.

ROSSONI, E. M. M.; GAYLARDE, C. C. Comparison of sodium hypochlorite and peracetic acid as sanitizing agents for stainless steel food processing surfaces using epifluorescence microscopy. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 61, n. 1, p. 81-85, 2000.

SALTER, M. G.; CONLON, H. E. Extraction of plant RNA. **Methods in Molecular Biology**, v. 362, parte 4, p. 309-314, 2007.

SELA, S. et al. A mutation in the *luxS* gene influences *Listeria monocytogenes* biofilm formation. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, D. C., v. 72, n. 8, p. 5653-5658, agosto 2006.

SHIN, J. H.; BRODY, M. S.; PRICE, C. W. Physical and antibiotic stresses require activation of the RsbU phosphatase to induce the general stress response in *Listeria monocytogenes*. **Microbiology**, v. 156, pt 9, 2660-9, setembro 2010.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. 3. ed. São Paulo: Varela, 2001. 317p.

SINDE, E.; CARBALLO, J. Attachment of *Salmonella* sp. and *Listeria monocytogenes* to stainless steel, rubber and polytetrafluorethylene: the influence of free energy and the effect of commercial sanitizers. **Food Microbiology**, v. 17, n. 4, p. 439-447, 2000.

SLEATOR, R. D.; GAHAN, C. G. M.; HILL, C. A postgenomic appraisal of osmotolerance in *Listeria monocytogenes*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, D. C., v. 69, n. 1, p. 1-9, janeiro 2003.

SLUTSKER, L.; SCHUCHAT, A. Listeriosis in humans. In: RYSER, E. T.; MARTH, E.H. **Listeria, Listeriosis and Food Safety**. 2nd. ed. New York: Marcel Dekker, Inc., 1999. p. 75-95.

STOLL, R.; GOEBEL, W. The major PEP-phosphotransferase systems (PTSs) for glucose, mannose and cellobiose of *Listeria monocytogenes*, and their significance for extra- and intracellular growth. **Microbiology**, v. 156, p. 1069-1083, abril 2010.

SUO, Y. et al. The expression of Superoxide Dismutase (SOD) and a Putative ABC Transporter Permease is inversely correlated during biofilm formation in *Listeria monocytogenes* 4b G. **PloS One**, v. 7, n. 10, e48467, outubro 2012.

SWAMINATHAN, B.; GERNER-SMIDT, P. The epidemiology of human listeriosis. **Microbes and Infection**, Paris, v. 9, n. 10, p. 1236-1243, agosto 2007.

TODHANAKASEM, T.; YOUNG, G. M. Loss of flagellum-based motility by *Listeria monocytogenes* results in formation of hyperbiofilms. **Journal of Bacteriology**, Washington, D. C., v. 190, p. 6030-6034, 2008.

TOLEDO-ARANA, A. et al. The *Listeria* transcriptional landscape from saprophytism to virulence. **Nature**, v. 459, p. 950-956, junho 2009.

TRACHOO, N. Biofilms and the food industry. **Songklanakarin Journal of Science and Technology**, Hat Yai, v. 25, n. 6. p. 807-815, novembro/dezembro 2003.

TREMOULET, F. et al. Comparison of protein patterns of *Listeria monocytogenes* grown in biofilm or in planktonic mode by proteomic analysis. **FEMS Microbiology Letters**, v. 210, n. 1, p. 25-31, abril 2002.

VAN DER VEEN, S.; ABEE, T. (a) Importance of SigB for *Listeria monocytogenes* static and continuous-flow biofilm formation and disinfectant resistance. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, D.C., v. 76, n. 23, p. 7854-7860, dezembro 2010.

VAN DER VEEN, S.; ABEE, T. (b) Dependence of continuous-flow biofilm formation by *Listeria monocytogenes* EGD-e on SOS response factor YneA. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, D. C., v. 76, n. 6, p. 1992-1995, março 2010.

VANEGAS, M. C. et al. Detection of *Listeria monocytogenes* in raw whole milk for human consumption in Columbia by real-time PCR. **Food Control**, Guildford, v. 20, n. 4, p. 430-432, abril 2009.

VANGUILDER, H. D.; VRANA, K. E.; FREEMAN, W. M. Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis. **Biotechniques**, v. 44, n. 5, p. 619-626, abril 2008.

VÁZQUEZ-BOLAND, J. A. et al. *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, D. C., v. 14, n. 3, p. 584–640, julho 2001.

WILLIAMS, T. et al. Construction and characterization of *Listeria monocytogenes* mutants with in-frame deletions in the response regulator genes identified in the genome sequence. **Infection and Immunity**, Washington, D. C.; v. 73, p. 3152-3159, 2005.

WIRTANEN, G.; MATTILA-SANDHOLM, T. **Effect of the growth phase of foodborne biofilms on their resistance to chlorine sanitizer**. Part II. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, v.25, p.50-54, 1992.