SÂNIA ALVES DOS SANTOS

Análise comparativa do processo de invasão de hepatócitos de rato por *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* Typhimurium: caracterização morfológica, quantificação da liberação de TNF-alfa e da morte celular por apoptose

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Área de concentração: Doenças Infecciosas e Parasitárias
Orientador: Dr. Dahir Ramos de Andrade Júnior

São Paulo
2008

Agradecimentos

Aos Drs. Dahir Ramos de Andrade e Dahir Ramos de Andrade Júnior, pela ajuda e apoio constante nas várias etapas da construção dessa Tese. Por terem acreditado no meu trabalho e capacidade, pelas orientações e atenção que me dispensaram.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Bacteriologia (LIM-54) do Departamento de Moléstias Infecciosas e Parasitárias, meus sinceros agradecimentos.

Ao Laboratório de Oncologia chefiado pelo Dr. Roger Chammas pelo auxílio no citômetro de fluxo. Agradeço especialmente a Andréia H. Otake pelas valiosas orientações em todas as fases da citometria de fluxo.

Aos professores que me inspiraram na busca pelo conhecimento, ética nas atividades científicas e persistência nas adversidades.

Aos pesquisadores de outros laboratórios, que me forneceram materiais e reagentes, aos bibliotecários, aos funcionários da Secretaria de Pós-Graduação do Programa de Doenças Infecciosas e Parasitárias e ao Biotério Central.

Aos meus familiares pelas orientações e pelo apoio em todos os momentos.

Essa tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento dessa publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver)

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A.L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 2ª ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2005.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

Lista de Tabelas	xiii
Lista de Figuras	xix
Resumo	xxviii
Summary	xxxix
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. <i>Listeria monocytogenes</i> : características morfológicas e epidemiológicas	3
1.1.1. Mecanismos de entrada na célula hospedeira	5
1.1.2. Estratégias de invasão de <i>Listeria monocytogenes</i>	10
1.2. <i>Salmonella</i> Typhimurium: características morfológicas e epidemiológicas	10
1.2.1. Mecanismos de entrada na célula hospedeira	12
1.2.2. Estratégias de invasão de <i>Salmonella</i> Typhimurium.	16
1.3. Interação entre bactérias e células hospedeiras: liberação de citocinas	17
1.4. Apoptose e o equilíbrio homeostático da célula: Mediação por TNF-alfa	19
1.5. Relação das bactérias com a apoptose	24

1.6.	Apoptose: exposição da Fosfatidilserina (PS) da membrana plasmática da célula e ligação à anexina	25
2.	OBJETIVOS	32
3.	MÉTODOS	33
3.1.	Cultura primária de hepatócitos de rato	33
3.2.	Cultura de bactérias	35
3.3.	Curvas de crescimento bacteriano	36
3.4.	Atividade hemolítica e fosfolipídica de <i>Listeria</i> <i>monocytogenes</i>	36
3.5.	Ensaio de invasão bacteriana em hepatócitos	37
3.6.	Detecção de TNF-alfa por ELISA	38
3.7.	Análise da morfologia celular por coloração de hematoxilina-eosina	40
3.8.	Análise da morfologia celular por Microscopia Eletrônica	40
3.9.	Detecção de apoptose por coloração TUNEL através de citometria de fluxo	41
3.10.	Detecção de apoptose com Anexina V marcada com FITC através de citometria de fluxo	43
3.11.	Análise Estatística	44

4.	Resultados	47
4.1.	Cultura de hepatócitos	47
4.2.	Curvas de crescimento de cepas de <i>L. monocytogenes</i> e <i>Salmonella</i> Typhimurium	48
4.3.	Atividade hemolítica e fosfolipídica de <i>L. monocytogenes</i>	49
4.4.	Recuperação de bactérias intracelulares	50
4.5.	Avaliação da liberação de TNF-alfa por hepatócitos invadidos por <i>S. Typhimurium</i> e <i>L. monocytogenes</i>	53
4.5.1.	Comparação entre a liberação de TNF-alfa por hepatócitos controle e hepatócitos estimulados com estaurosporina	53
4.5.2.	Comparação entre a liberação de TNF-alfa por hepatócitos invadidos por <i>S. Typhimurium</i> em diferentes concentrações	55
4.5.3.	Comparação entre a liberação de TNF-alfa por hepatócitos invadidos por <i>L. monocytogenes</i> 4a em diferentes concentrações	58
4.5.4.	Comparação entre a liberação de TNF-alfa por hepatócitos invadidos por <i>L. monocytogenes</i> 4b em diferentes concentrações	61

4.5.5.	Comparação entre a liberação de TNF-alfa por hepatócitos invadidos por <i>L. monocytogenes</i> 1/2a em diferentes concentrações	64
4.5.6.	Teste de comparação múltipla de Dunnet entre as taxas de liberação de TNF-alfa dos grupos controle, estaurosporina e <i>S. Typhimurium</i> em diferentes concentrações	67
4.5.7.	Teste de comparação múltipla de Dunnet entre as taxas de liberação de TNF-alfa dos grupos controle, estaurosporina e <i>L. monocytogenes</i> 4a em diferentes concentrações	70
4.5.8.	Teste de comparação múltipla de Dunnet entre as taxas de liberação de TNF-alfa dos grupos controle, estaurosporina e <i>L. monocytogenes</i> 4b em diferentes concentrações	74
4.5.9.	Teste de comparação múltipla de Dunnet entre as taxas de liberação de TNF-alfa dos grupos controle, estaurosporina e <i>L. monocytogenes</i> 1/2a em diferentes concentrações	78

4.5.10.	Teste de comparação múltipla de Dunnett entre as taxas de liberação de TNF-alfa dos grupos <i>S. Typhimurium</i> , <i>L. monocytogenes</i> 4a, 4b e 1/2a na concentração 5×10^{10}	82
4.5.11.	Teste de comparação múltipla de Dunnett entre as capacidades de produção de TNF-alfa do grupo <i>S. Typhimurium</i> em diferentes concentrações	85
4.5.12.	Teste de comparação múltipla de Dunnett entre as capacidades de produção de TNF-alfa do grupo <i>L. monocytogenes</i> 4a em diferentes concentrações	89
4.5.13.	Teste de comparação múltipla de Dunnett entre as capacidades de produção de TNF-alfa do grupo <i>L. monocytogenes</i> 4b em diferentes concentrações	92
4.5.14.	Teste de comparação múltipla de Dunnett entre as capacidades de produção de TNF-alfa do grupo <i>L. monocytogenes</i> 1/2a em diferentes concentrações	95
4.5.15.	Teste de comparação múltipla de Dunnett entre as capacidades de produção de TNF-alfa dos grupos controle, estaurosporina, <i>S. Typhimurium</i> e <i>L. monocytogenes</i> 4a, 4b e 1/2a na concentração 5×10^{10}	99

4.5.16.	Avaliação do melhor tempo de incubação através da média da linearidade entre <i>S. Typhimurium</i> e <i>L. monocytogenes</i> (4a, 4b e 1/2a)	102
4.6.	Apoptose quantificada pela técnica TUNEL através de Citometria de Fluxo, entre os grupos controle, estaurosporina, <i>S. Typhimurium</i> e <i>L. monocytogenes</i> 4a, 4b e 1/2a	103
4.6.1.	Comparação entre as taxas de apoptose dos hepatócitos induzidas por <i>S. Typhimurium</i> e <i>L. monocytogenes</i> 4a, 4b e 1/2a	104
4.6.2.	Comparação entre as capacidades de apoptose dos hepatócitos induzidas por <i>S. Typhimurium</i> e <i>L. monocytogenes</i> 4a, 4b e 1/2a	106
4.7.	Apoptose estimada pela técnica de Anexina por Citometria de Fluxo, em hepatócitos invadidos por <i>S. Typhimurium</i> e <i>L. monocytogenes</i> 4a, 4b e 1/2a	108
4.7.1.	Avaliação estatística das taxas de apoptose estimadas pela técnica da anexina, em hepatócitos invadidos por <i>S. Typhimurium</i> e <i>L. monocytogenes</i> (4a, 4b e 1/2a)	110

4.7.2.	Avaliação estatística das capacidades de apoptose em hepatócitos invadidos por <i>S. Typhimurium</i> e <i>L. monocytogenes</i> 4a, 4b e 1/2a	112
4.7.3.	Avaliação estatística das taxas de necrose estimadas pela técnica da anexina, em hepatócitos invadidos por <i>S. Typhimurium</i> e <i>L. monocytogenes</i>	115
4.7.4.	Avaliação estatística das capacidades de necrose, estimadas pela técnica da anexina, em hepatócitos invadidos por <i>S. Typhimurium</i> e <i>L. monocytogenes</i>	117
4.7.5.	Avaliação estatística das taxas de apoptose tardia estimadas pela técnica da anexina, em hepatócitos invadidos por <i>S. Typhimurium</i> e <i>L.monocytogenes</i>	119
4.7.6.	Avaliação estatística das capacidades de apoptose tardia estimadas pela técnica da anexina, em hepatócitos invadidos por <i>S. Typhimurium</i> e <i>L.monocytogenes</i>	121
4.8.	Análise morfológica de hepatócitos invadidos por <i>S. Typhimurium</i> e <i>L. monocytogenes</i> 4a, 4b e 1/2a, através de microscopia óptica e microscopia eletrônica	123
5.	DISCUSSÃO	135

6.	CONCLUSÕES	157
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	159

Apêndice I

Apêndice II

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Alterações na morfologia celular e eventos moleculares durante a apoptose	21
Tabela 2	Variação na recuperação de <i>S. Typhimurium</i> em culturas de hepatócitos invadidos, semeadas em ágar sangue (contagem de bactérias em placa)	50
Tabela 3	Variação na recuperação de <i>L. monocytogenes</i> 4a em culturas de hepatócitos invadidos, semeadas em ágar sangue (contagem de bactérias em placa)	51
Tabela 4	Variação na recuperação de <i>L. monocytogenes</i> 4b em culturas de hepatócitos invadidos, semeadas em ágar sangue (contagem de bactérias em placa)	51
Tabela 5	Variação da recuperação de <i>L. monocytogenes</i> 1/2a de culturas de hepatócitos invadidos, semeadas em ágar sangue (contagem de bactérias em placa)	52
Tabela 6	Variação da liberação de TNF-alfa por hepatócitos invadidos por <i>S. Typhimurium</i> e <i>L. monocytogenes</i> sorogrupos 4a, 4b e 1/2a	Apêndice I

Tabela 7	Comparação da taxa de liberação de TNF- alfa e capacidade de produção entre os grupos controle e estaurosporina	53
Tabela 8	Comparação da taxa de liberação de TNF- alfa e capacidade de produção entre diferentes concentrações de <i>S. Typhimurium</i>	56
Tabela 9	Comparação da taxa de liberação de TNF- alfa e capacidade entre diferentes concentrações de <i>L. monocytogenes</i> 4a	59
Tabela 10	Comparação da taxa de liberação e capacidade de produção de TNF-alfa entre diferentes concentrações de <i>L.</i> <i>monocytogenes</i> 4b	62
Tabela 11	Comparação da taxa de liberação de TNF- alfa e capacidade entre diferentes concentrações de <i>L. monocytogenes</i> 4b	65
Tabela 12	Comparação entre as taxas de liberação de TNF-alfa nos grupos controle, estaurosporina e <i>S. Typhimurium</i> , em diferentes concentrações	67
Tabela 13	Comparação entre as taxas de liberação de TNF-alfa dos grupos controle, estaurosporina e <i>L. monocytogenes</i> 4a, em diferentes concentrações	71

Tabela 14	Comparação entre as taxas de liberação de TNF-alfa dos grupos controle, estaurosporina e <i>L. monocytogenes</i> 4b, em diferentes concentrações	75
Tabela 15	Comparação entre as taxas de liberação de TNF-alfa dos grupos controle, estaurosporina e <i>L. monocytogenes</i> 1/2a, em diferentes concentrações	79
Tabela 16	Comparação entre as taxas de liberação de TNF-alfa dos grupos controle, estaurosporina <i>S. Typhimurium</i> e <i>L. monocytogenes</i> (4a, 4b e 1/2a), em diferentes concentrações	83
Tabela 17	Comparação entre as capacidades de produção de TNF-alfa dos grupos controle, estaurosporina e <i>S. Typhimurium</i> , em diferentes concentrações	86
Tabela 18	Comparação entre as capacidades de produção de TNF-alfa dos grupos controle, estaurosporina e <i>L. monocytogenes</i> 4a, em diferentes concentrações	90
Tabela 19	Comparação entre as capacidades de produção de TNF-alfa dos grupos controle, estaurosporina e <i>L. monocytogenes</i> 4b, em diferentes concentrações	93

Tabela 20	Comparação entre as capacidades de produção de TNF-alfa dos grupos controle, estaurosporina e <i>L. monocytogenes</i> 1/2a em diferentes concentrações	96
Tabela 21	Comparação entre as capacidades de produção de TNF-alfa dos grupos controle, estaurosporina, <i>S. Typhimurium</i> e <i>L. monocytogenes</i> , em diferentes concentrações	100
Tabela 22	Comparação entre tempos de incubação através da média da linearidade	102
Tabela 23	Porcentagens de apoptose obtidas pela técnica TUNEL	Apêndice I
Tabela 24	Média e desvio-padrão das taxas de apoptose dos hepatócitos invadidos por <i>S. Typhimurium</i> e <i>L. monocytogenes</i> (4a, 4b e 1/2a)	104
Tabela 25	Comparação entre taxas de apoptose pelo pós-teste Student-Newman-Keuls	105
Tabela 26	Média e desvio-padrão das capacidades de apoptose dos hepatócitos invadidos por <i>S. Typhimurium</i> e <i>L. monocytogenes</i> (4a, 4b e 1/2a)	107

Tabela 27	Comparação entre as capacidades de apoptose pelo pós-teste Student-Newman-Keuls	107
Tabela 28	Médias das porcentagens de apoptose obtidas pela técnica da anexina	Apêndice I
Tabela 29	Média e desvio-padrão das taxas de apoptose dos hepatócitos invadidos por <i>S. Typhimurium</i> e <i>L. monocytogenes</i> (4a, 4b e 1/2a)	110
Tabela 30	Comparação entre as taxas de apoptose pelo pós-teste Student-Newman-Keuls	111
Tabela 31	Média e desvio-padrão das capacidades de apoptose dos hepatócitos invadidos por <i>S. Typhimurium</i> e <i>L. monocytogenes</i> (4a, 4b e 1/2a)	113
Tabela 32	Comparação entre as capacidades de apoptose pelo pós-teste Student-Newman-Keuls	113
Tabela 33	Média e desvio-padrão das taxas de necrose de hepatócitos invadidos por <i>S. Typhimurium</i> e <i>L. monocytogenes</i> (4a, 4b e 1/2a)	115
Tabela 34	Comparação entre as taxas de necrose pelo pós-teste Student-Newman-Keuls	116

Tabela 35	Média e desvio-padrão das capacidades de necrose dos hepatócitos invadidos por <i>S. Typhimurium</i> e <i>L. monocytogenes</i> (4a, 4b e 1/2a)	117
Tabela 36	Comparação entre as capacidades de necrose pelo pós-teste Student-Newman-Keuls	118
Tabela 37	Média e desvio-padrão das taxas de apoptose tardia dos hepatócitos invadidos por <i>S. Typhimurium</i> e <i>L. monocytogenes</i> (4a, 4b e 1/2a)	119
Tabela 38	Comparação entre as capacidades de apoptose tardia dos hepatócitos invadidos por <i>S. Typhimurium</i> e <i>L. monocytogenes</i> (4a, 4b e 1/2a)	120
Tabela 39	Média e desvio-padrão das capacidades de apoptose tardia dos hepatócitos invadidos por <i>S. Typhimurium</i> e <i>L. monocytogenes</i> (4a, 4b e 1/2a)	121
Tabela 40	Comparação entre as capacidades de apoptose tardia dos hepatócitos invadidos por <i>S. Typhimurium</i> e <i>L. monocytogenes</i> (4a, 4b e 1/2a)	122

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Distribuição mundial de <i>Listeria monocytogenes</i>	2
Figura 2	Mecanismo “zipper”	6
Figura 3	As estratégias invasivas	7
Figura 4	Mecanismo “trigger”	13
Figura 5	Sistema de secreção do tipo III de <i>S. Typhimurium</i>	15
Figura 6	Vias de invasão da <i>Salmonella</i> pelo epitélio intestinal.	16
Figura 7	Visão esquemática da apoptose em hepatócitos	23
Figura 8	Cascata apoptótica	24
Figura 9	Representação esquemática da perda da assimetria da membrana lipídica durante a apoptose.	29
Figura 10	Representação esquemática da regulação da assimetria de PS da membrana plasmática.	29
Figura 11	Procedimento para dosagem de TNF-alfa por ELISA.	39

Figura 12	Curvas de crescimento das bactérias <i>Salmonella</i> Typhimurium (ST) e <i>Listeria monocytogenes</i> (LM) (sorogrupos 4a, 4b e 1/2a).....	49
Figura 13	Liberação de TNF-alfa (pg/ml) por hepatócitos controle e hepatócitos estimulados com estaurosporina, ao longo do tempo.	54
Figura 14	Liberação de TNF-alfa por hepatócitos invadidos por <i>S. Typhimurium</i> ao longo do tempo, nas concentrações 5×10^5 a 5×10^{10}	57
Figura 15	Liberação de TNF-alfa por hepatócitos invadidos por <i>L. monocytogenes</i> 4a ao longo do tempo, nas concentrações 5×10^5 a 5×10^{10}	60
Figura 16	Liberação de TNF-alfa por hepatócitos invadidos por <i>L. monocytogenes</i> 4b ao longo do tempo, nas concentrações 5×10^5 a 5×10^{10}	63
Figura 17	Liberação de TNF-alfa por hepatócitos invadidos por <i>L. monocytogenes</i> 1/2a ao longo do tempo, nas concentrações 5×10^5 a 5×10^{10}	66

Figura 18	Aplicação do Teste de Dunnett, comparando as taxas de liberação de TNF-alfa entre hepatócitos controle e hepatócitos invadidos por <i>S. Typhimurium</i> nas concentrações 5×10^5 - 5×10^{10}	69
Figura 19	Aplicação do Teste de Dunnett, comparando as taxas de liberação de TNF-alfa entre hepatócitos controle e invadidos por <i>L. monocytogenes 4a</i> nas concentrações 5×10^5 - 5×10^{10}	73
Figura 20	Aplicação do Teste de Dunnett, comparando as taxas de liberação de TNF-alfa entre hepatócitos controle e invadidos por <i>L. monocytogenes 4b</i> nas concentrações 5×10^5 - 5×10^{10}	77
Figura 21	Aplicação do Teste de Dunnett, comparando as taxas de liberação de TNF-alfa entre hepatócitos controle e invadidos por <i>L. monocytogenes 1/2a</i> nas concentrações 5×10^5 - 5×10^{10}	81
Figura 22	Aplicação do Teste de Dunnett, comparando as taxas de liberação de TNF-alfa entre hepatócitos invadidos por <i>S. Typhimurium</i> e <i>L. monocytogenes 4a, 4b e 1/2a</i> na concentração 5×10^{10}	84

Figura 23	Aplicação do Teste de Dunnett, comparando as capacidades de produção de TNF-alfa entre hepatócitos controle e invadidos por <i>S. Typhimurium</i> nas concentrações 5×10^5 - 5×10^{10}	88
Figura 24	Aplicação do Teste de Dunnett, comparando as capacidades de produção de TNF-alfa entre hepatócitos controle e invadidos por <i>L. monocytogenes</i> 4a nas concentrações 5×10^5 - 5×10^{10}	91
Figura 25	Aplicação do Teste de Dunnett, comparando as capacidades de produção de TNF-alfa entre hepatócitos controle e invadidos por <i>L. monocytogenes</i> 4b nas concentrações 5×10^5 - 5×10^{10}	94
Figura 26	Aplicação do Teste de Dunnett, comparando as capacidades de produção de TNF-alfa entre hepatócitos controle e invadidos por <i>L. monocytogenes</i> 1/2a nas concentrações 5×10^5 - 5×10^{10}	98
Figura 27	Aplicação do Teste de Dunnett, comparando as capacidades de produção de TNF-alfa entre hepatócitos invadidos por <i>S. Typhimurium</i> e <i>L. monocytogenes</i> 4a, 4b e 1/2a na concentração 5×10^{10}	101

Figura 28	Gráfico da variação da média da linearidade entre 1h e 6h de incubação das diferentes cepas bacterianas com hepatócitos	103
Figura 29	Frequência de apoptose em hepatócitos controle-negativos e controle-positivos (TUNEL)	Apêndice I
Figura 30	Frequência de apoptose em hepatócitos invadidos por <i>S. Typhimurium</i> (TUNEL)	Apêndice I
Figura 31	Frequência de apoptose em hepatócitos invadidos por <i>L. monocytogenes</i> 4a (TUNEL)	Apêndice I
Figura 32	Frequência de apoptose em hepatócitos invadidos por <i>L. monocytogenes</i> 4b (TUNEL)	Apêndice I
Figura 33	Frequência de apoptose em hepatócitos invadidos por <i>L. monocytogenes</i> 1/2a (TUNEL)	Apêndice I
Figura 34	Comparação entre taxas de apoptose induzidas por <i>S. Typhimurium</i> e <i>L. monocytogenes</i> 4a, 4b e 1/2a (método TUNEL)	105
Figura 35	Comparação entre as capacidades de apoptose dos hepatócitos induzida por <i>S. Typhimurium</i> e <i>L. monocytogenes</i> 4a, 4b e 1/2a	107
Figura 36	Análise por citometria de fluxo de hepatócitos marcados com anexina V-FITC invadidos por ST (A), LM 4a (B), LM 4b (C) e LM 1/2a (D)	109

Figura 37	Frequência de apoptose (anexina) em hepatócitos controle-positivos e controle-negativos	Apêndice I
Figura 38	Apoptose em hepatócitos invadidos entre 1h e 6h por <i>S. Typhimurium</i> em diferentes concentrações (anexina)	Apêndice I
Figura 39	Frequência de apoptose em hepatócitos invadidos por <i>L. monocytogenes</i> 4a entre 1h e 6h de incubação em diferentes concentrações (anexina)	Apêndice I
Figura 40	Frequência de apoptose em hepatócitos invadidos entre 1h e 6h por <i>L. monocytogenes</i> 4b em diferentes concentrações (anexina)	Apêndice I
Figura 41	Frequência de apoptose em hepatócitos invadidos entre 1h e 6h por <i>L. monocytogenes</i> 1/2a em diferentes concentrações (anexina)	Apêndice I
Figura 42	Comparação entre as taxas de apoptose de hepatócitos induzidos por <i>S. Typhimurium</i> e <i>L. monocytogenes</i> 4a, 4b e 1/2a (anexina).	111
Figura 43	Comparação entre as capacidades de apoptose de hepatócitos induzidos por <i>S. Typhimurium</i> e <i>L. monocytogenes</i> 4a, 4b e 1/2a (anexina)	114

Figura 44	Comparação entre as taxas de necrose de hepatócitos induzidos por <i>S. Typhimurium</i> e <i>L. monocytogenes</i> 4a, 4b e 1/2a (anexina)	116
Figura 45	Comparação entre as capacidades de necrose de hepatócitos induzidos por <i>S. Typhimurium</i> e <i>L. monocytogenes</i> 4a, 4b e 1/2a (anexina)	118
Figura 46	Comparação entre as taxas de apoptose tardia de hepatócitos induzidos por <i>S. Typhimurium</i> e <i>L. monocytogenes</i> 4a, 4b e 1/2a (anexina)	120
Figura 47	Comparação entre as capacidades de apoptose tardia de hepatócitos induzidos por <i>S. Typhimurium</i> e <i>L. monocytogenes</i> (anexina)	122
Figura 48	Hepatócitos controle corados com HE e vistos sob microscopia óptica (400X)	124
Figura 49	Hepatócitos invadidos por <i>L. monocytogenes</i> 4a, após 3h de incubação, corados com HE (MOI 5000) (200x)	124
Figura 50	Hepatócitos invadidos por <i>Salmonella Typhimurium</i> , após 4h de incubação, corados com HE (MOI 500) (400x)	125

Figura 51	Hepatócitos invadidos por <i>Listeria monocytogenes</i> 4b após 1h de incubação, corados com HE (MOI 500) (200x).....	125
Figura 52	Hepatócitos invadidos por <i>L. monocytogenes</i> 4b, após 3h de incubação, corados com HE (MOI 5000) (400x).....	126
Figura 53	Hepatócitos invadidos por <i>Listeria monocytogenes</i> 1/2a, após 3h de incubação, corados com HE (MOI 500) (400x)......	126
Figura 54	Hepatócitos invadidos por <i>Listeria monocytogenes</i> 1/2a, após 4h de incubação, corados com HE (MOI 5000) (200x)......	127
Figura 55	Micrografia de hepatócitos controle (6000x).	128
Figura 56	Micrografia de hepatócito invadido por <i>S. Typhimurium</i> , após 3h de incubação (MOI 500) (5000x).	129
Figura 57	Micrografia de hepatócito invadido por <i>Salmonella Typhimurium</i> em processo de morte por apoptose, após 6h de incubação (MOI 5000) (5000x).	130
Figura 58	Micrografia de hepatócito invadido por <i>L. monocytogenes</i> 4b, após 1h de incubação (MOI 5000) (12000x).	131

Figura 59	Micrografia de hepatócito invadido por <i>L. monocytogenes</i> 4a, após 1h de incubação (MOI 5000) (5000x).	132
Figura 60	Micrografia de hepatócito em apoptose invadido por <i>Listeria monocytogenes</i> 4a, após 4h de incubação (MOI 50000) (5000x).	133
Figura 61	Micrografia de hepatócito em apoptose invadido por <i>Listeria monocytogenes</i> 4b, após 3h de incubação (MOI 5000). (5000x).	134

RESUMO

Santos SA. Análise comparativa do processo de invasão de hepatócitos de rato por *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* Typhimurium: Caracterização morfológica, quantificação da liberação de TNF-alfa e da morte celular por apoptose [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2008. 187p.

INTRODUÇÃO: Os hepatócitos apresentam papel potencial em iniciar e amplificar a resposta inflamatória aguda no fígado, através da liberação de citocinas pró-inflamatórias, em papel complementar ao exercido pelas células de Kupffer e endoteliais. A invasão bacteriana da célula hepática é um estímulo para que o hepatócito produza citocinas como o TNF-alfa, capaz de induzir sua própria morte por apoptose. O TNF-alfa pode ser tanto um agente citotóxico (induzindo a morte celular), quanto um agente protetor (através da ativação de NF- κ B). A morte por apoptose do hepatócito libertaria as bactérias que seriam destruídas pelo sistema imunológico hepático ativado. *Salmonella* Typhimurium (ST) e *Listeria monocytogenes* (LM) são patógenos responsáveis por importantes doenças de origem alimentar. O hepatócito é o maior local de replicação bacteriana no fígado. As conseqüências da invasão bacteriana dos hepatócitos e sua repercussão na produção de TNF-alfa e na morte celular necessitam ser melhor

avaliadas. MÉTODOS: Nesse estudo procuramos investigar o comportamento dos hepatócitos invadidos por ST e LM sorogrupos 4a, 4b e 1/2a, analisando os seguintes parâmetros: a) morfologia = por microscopia óptica (MO) (hematoxilina e eosina) e por microscopia eletrônica (ME); b) dosagem do TNF-alfa liberado pelos hepatócitos invadidos = o TNF-alfa liberado foi detectado por técnica ELISA no sobrenadante das culturas; c) pesquisa da morte celular por apoptose = avaliada através das técnicas TUNEL e anexina (citometria de fluxo). Para todos os parâmetros foi realizada análise comparativa estatística entre os quatro tipos de bactéria. RESULTADOS: As monocamadas de hepatócitos agredidas por *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* Typhimurium apresentam ruptura em sua distribuição, e sinais de desorganização citoplasmática e nuclear. Para as bactérias ST, LM 4a, LM 4b e LM 1/2a obtivemos os seguintes valores em seqüência: a) taxa de liberação de TNF-alfa (pg/mL): $146,9 \pm 18,38$; $94,71 \pm 13,89$; $94,52 \pm 15,66$ e $58,16 \pm 15,49$; b) capacidade de produção de TNF-alfa (pg/mL): $-67,20 \pm 71,56$; $-46,49 \pm 54,10$; $-106,3 \pm 61,0$ e $58,16 \pm 15,49$; c) taxa de apoptose avaliada por TUNEL em unidade de área (UA): $23,86 \pm 1,614$; $15,92 \pm 0,9343$; $21,14 \pm 1,421$ e $23,93 \pm 1,263$; d) capacidades de produção de apoptose por TUNEL em UA: $-50,67 \pm 12,42$; $10,81 \pm 7,186$; $-17,22 \pm 10,93$ e $-40,27 \pm 9,712$; e) taxas de apoptose por anexina em UA: $12,51 \pm 2,052$; $23,10 \pm 3,481$; $26,61 \pm 3,414$ e $18,57 \pm 2,497$; f) capacidades de produção de apoptose por anexina em UA: $-63,31 \pm 15,79$; $-126,4 \pm 26,78$; $-142,0 \pm 26,26$ e $-97,75 \pm 19,21$. CONCLUSÕES: a) ocorre liberação de TNF-

alfa pelos hepatócitos invadidos, sendo que a *Salmonella* Typhimurium foi responsável pela maior taxa de liberação de TNF-alfa, e *Listeria monocytogenes* 4b pela maior capacidade de produção de TNF-alfa; b) ocorre morte por apoptose dos hepatócitos invadidos por bactérias, avaliada através da técnica TUNEL, sendo que *Salmonella* Typhimurium e *Listeria monocytogenes* 1/2a foram responsáveis pelas maiores taxas e capacidades de produção de apoptose; c) ocorre morte dos hepatócitos invadidos por apoptose, avaliada através da técnica da anexina, sendo que *Listeria monocytogenes* 4b foi responsável pelas maiores taxas e capacidades de produção de apoptose; d) os hepatócitos cultivados invadidos pelas bactérias *Salmonella* Typhimurium e *Listeria monocytogenes* apresentam alterações morfológicas, com ruptura da distribuição da monocamada, e sinais de desorganização citoplasmática e nuclear.

Descritores: *Listeria monocytogenes* / patogenicidade *Salmonella* Typhimurium / patogenicidade Hepatócitos Apoptose Fator de necrose tumoral alfa Infecções bacterianas Ratos Wistar.

SUMMARY

Santos SA. Comparative analysis of rat hepatocytes invasion process by *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* Typhimurium: Morphological characterization, quantification of TNF-alpha release and cellular death by apoptosis [thesis]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2008. 187p.

INTRODUCTION: Hepatocytes can play an important role in the initiation or amplification of the hepatic acute inflammatory response, through the release of proinflammatory cytokines. The bacterial invasion of hepatocyte is a stimulus for production of TNF-alpha by these cells, and this phenomenon induces its own death by apoptosis. TNF-alpha is as a cytotoxic agent (inducing cellular death), as a protector agent (through NF- κ B activation). The hepatocyte death by apoptosis may release intracellular bacteria that would be destroyed by hepatic immunological system. *Salmonella* Typhimurium (ST) and *Listeria monocytogenes* (LM) are important foodborne pathogens. The hepatocyte is the major site of bacterial replication in the liver. The consequences of hepatocytes' bacterial invasion must be better evaluated. METHODS: In the present work we show the behavior of hepatocytes invaded by ST and LM serotypes 4a, 4b and 1/2a, through: a) morphology = by optic microscopy (OM) (hematoxylin-eosin staining) and electronic microscopy (EM); b) quantification of TNF-alpha released by hepatocytes = TNF-alpha released was determined by ELISA in culture

supernatants; c) evaluation of apoptotic cell death by TUNEL and annexin techniques (flow cytometry). For all parameters were made a statistical comparative analysis among the four types of bacteria. RESULTS: The hepatocytes monolayers invaded by LM and ST presented ruptures in your organization, and signs of nuclear and cytoplasmic disorder. For the bacteria ST, LM 4a, LM 4b and LM 1/2a we obtained the following values respectively: a) rate of TNF-alpha released (pg/mL): $146,9 \pm 18,38$; $94,71 \pm 13,89$; $94,52 \pm 15,66$ and $58,16 \pm 15,49$; b) capacities of TNF-alpha production (pg/mL): $-67,20 \pm 71,56$; $-46,49 \pm 54,10$; $-106,3 \pm 61,0$ and $58,16 \pm 15,49$; c) rate of apoptosis by TUNEL in unit of area (UA): $23,86 \pm 1,614$; $15,92 \pm 0,9343$; $21,14 \pm 1,421$ and $23,93 \pm 1,263$; d) capacities of apoptosis production by TUNEL in UA: $-50,67 \pm 12,42$; $10,81 \pm 7,186$; $-17,22 \pm 10,93$ and $-40,27 \pm 9,712$; e) rate of apoptosis by annexin in UA: $12,51 \pm 2,052$; $23,10 \pm 3,481$; $26,61 \pm 3,414$ and $18,57 \pm 2,497$; f) capacities of apoptosis production by annexin in UA: $-63,31 \pm 15,79$; $-126,4 \pm 26,78$; $-142,0 \pm 26,26$ and $-97,75 \pm 19,21$. CONCLUSIONS: a) ST was responsible for the major rate of TNF-alpha released and LM 4b was responsible for the major capacity of TNF-alpha production; b) ST and LM 1/2a caused the major rates and capacities of apoptosis, production, evaluated by TUNEL technique; c) LM 4b was responsible for the major rates and capacities of apoptosis production, evaluated by annexin technique; d) the cultured hepatocytes invaded by bacteria ST and LM presented morphological

alterations, with monolayer rupture, and signs of nuclear and cytoplasmic disorder.

Descriptors: *Listeria monocytogenes* / pathogenicity *Salmonella*
Typhimurium / pathogenicity Hepatocytes Apoptosis Tumor necrosis
factor-alpha Bacterial infections Rats, Wistar.

1. INTRODUÇÃO

As doenças de origem alimentar são definidas como de natureza infecciosa e tóxica, causadas por agentes que entram no organismo através da ingestão de alimentos. Essas doenças representam um problema crescente na saúde pública de países desenvolvidos e em desenvolvimento.

Estima-se que a incidência global de doenças de origem alimentar, com morte por diarreia, seja da ordem de 1,5 milhões de pessoas ao ano segundo a World Health Organization (WHO). Em países industrializados, a porcentagem de pessoas sofrendo de doenças de origem alimentar atinge 30% ao ano. Enquanto a maioria das doenças de origem alimentar tem apresentação esporádica e frequentemente não é divulgada, surtos desse tipo de doença podem assumir proporções gigantescas.

A Salmonelose é uma das doenças de origem alimentar mais comuns, tendo distribuição ampla. Mesmo nos dias atuais, constitui-se num dos principais ônus à saúde pública mundial, representando custo econômico significativo para muitos países. Segundo o WHO, milhões de casos da doença são registrados no mundo inteiro a cada ano, com incidência de mortes elevada (WHO). Nos últimos anos, problemas relacionados à *Salmonella* têm aumentado significativamente em incidência e gravidade (WHO).

Listeria monocytogenes é considerada uma bactéria emergente, devido ao papel dos alimentos em sua transmissão. A listeriose está

freqüentemente associada ao consumo de alimentos como queijos e carnes processadas, que são mantidos refrigerados por muito tempo, devido à característica dessa bactéria de crescer em baixas temperaturas. Surto de listeriose têm sido relatados em vários países, incluindo Austrália, Suécia, França e Estados Unidos (figura 1).

Figura 1 - Distribuição mundial de *Listeria monocytogenes*

FONTE: <http://www.pathogencombat.com/Industry/industry-home-french/Interesting-Articles.aspx>

Patógenos intracelulares como as *Salmonellas* e as *Listerias* desenvolveram sofisticados mecanismos para subverter as funções normais da célula hospedeira, e se multiplicar em seu interior. Em contrapartida, células do sistema imune inato desenvolveram estratégias para detectar a presença desses patógenos, e controlar sua multiplicação, seja através da produção de citocinas como o TNF-alfa, seja pela ativação das vias de sinalização apoptóticas.

1.1. *Listeria monocytogenes*: características morfológicas e epidemiológicas

Em 1924, Murray, Webb e Swann relataram o primeiro isolamento de *L. monocytogenes* (Murray et al., 1926). Pirie em 1930 isolou esse microorganismo em roedores, e alterou o nome para *Listerella hepatolytica*, em homenagem ao cirurgião britânico, Sir Joseph Lister. A denominação *Listeria monocytogenes* foi definida em 1940, e em 1948 foi incluída no manual bacteriológico determinativo de Bergey (Breed et al., 1948).

L. monocytogenes é um cocobacilo gram-positivo que produz β -hemólise, que está presente no solo e água, e pode ser encontrado no trato gastrointestinal de animais, e em até 5% de adultos humanos saudáveis (Lorber, 1997).

Segundo o manual de bacteriologia determinativa de Bergey (Seeliger e Jones, 1986), há sete espécies no gênero *Listeria*: *L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. innocua*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri*, *L. grayi* e *L. murrayi*. Dessas, apenas duas são consideradas importantes como patógenos: *L. monocytogenes*, para seres humanos e animais, e *L. ivanovii*, principalmente para animais, particularmente o carneiro.

Listeria é um patógeno de origem alimentar, responsável por várias doenças clínicas como: meningite, meningoencefalite, septicemia, abortos, gastroenterite, tanto em indivíduos saudáveis, como em pacientes imunocomprometidos (que apresentam doenças mais graves). A taxa de mortalidade global das doenças por *Listeria* chega a 20% (Lorber, 1997). Os sintomas clínicos (diarréia e sintomas de gripe) (Farber e Losos, 1988) em

humanos são devidos à habilidade única desse organismo para atravessar três barreiras durante a infecção: a barreira intestinal, a barreira sangue–cérebro, e a barreira placentária. Essa última característica assume grande importância, pois cerca de 25% dos casos de listeriose invasiva ocorre em mulheres grávidas (Chaturongakul et al, 2008).

Há 13 sorotipos descritos de *L. monocytogenes*, sendo que os sorotipos 1/2a, 1/2b e 4b são responsáveis por 95% das infecções humanas (Nelson et al., 2004). Dentre as cepas recuperadas de alimentos ou de fábricas de processamento de alimentos, as cepas 1/2a são as mais freqüentemente encontradas (Gorski et al., 2006). As cepas de sorotipo 4b estão são as responsáveis pela maioria das epidemias, bem como por casos isolados de listeriose.

Várias peculiaridades das cepas de sorotipos 4b e 1/2a foram descritas previamente. Buncic et al (2001) demonstraram que à 4°C, as cepas de sorotipo 1/2a sobreviviam mais que as 4b quando expostas a bacteriocinas. Além disso, as cepas sorotipo 4b sobreviviam mais aos tratamentos à quente, imediatamente seguidos de estocagem ao frio, do que as cepas de sorotipo 1/2a.

Dessa forma, as cepas de *L. monocytogenes* isoladas de diferentes fontes, como amostras clínicas e alimentos, têm diferentes potenciais de respostas patogênicas às condições ambientais. Essas diferenças podem dever-se à presença de linhagens distintas, com características patogênicas e de sobrevivência únicas, que podem ter se desenvolvido através de adaptação a hospedeiros e condições ambientais específicos.

1.1.1. Mecanismos de entrada na célula hospedeira

Listeria pode ser engolfada por fagócitos profissionais, tais como os macrófagos ou neutrófilos, e também por células que são geralmente consideradas não-fagocíticas, incluindo células do epitélio intestinal, hepatócitos e células endoteliais (Ireton, 2007).

Células não-fagocíticas têm baixa capacidade microbicida, e podem servir como nichos de replicação bacteriana. A internalização de *Listeria* requer participação ativa tanto da bactéria quanto da célula hospedeira (Ireton, 2007).

Listeria monocytogenes é equipada com proteínas de adesão celular transmembrana e receptores para entrar nas células de mamíferos (figura 2). A entrada pode ser dividida em três etapas sucessivas: a) Contato e aderência: essa etapa é independente do citoesqueleto de actina e envolve apenas o ligante e seu receptor. Isso leva ao agrupamento dos receptores. b) Formação do cálice fagocítico: essa etapa é iniciada por sinais que ocorrem após a formação dos primeiros complexos ligante-receptor e propagam-se em torno do micróbio invasor. Esses sinais induzem a polimerização da actina e extensão da membrana. c) Fechamento da cúpula fagocítica, retração, e despolimerização da actina (Cossart e Sansonetti, 2004).

Figura 2 - Mecanismos usados pelas bactérias para entrar nas células.
No mecanismo "zipper" usado por *Listeria monocytogenes*, a entrada na célula é iniciada do lado externo pela interação entre adesinas bacterianas (internalinas) e moléculas de superfície da célula hospedeira. Essa interação ativa vias de sinalização da célula hospedeira que resultam em rearranjos moderados do citoesqueleto de actina

FONTE: Alonso e Portillo, 2004

Figura 3 - As estratégias invasivas dos patógenos enteroinvasivos. Visão da barreira física exercida pelas células epiteliais intestinais (IECs) contra as bactérias intestinais, e o papel das células M permitindo amostragem da flora luminal. *L. monocytogenes* são fagocitadas, mas escapam para dentro do citoplasma, evitando serem mortas nos compartimentos lisossomais

FONTE: Cossart e Sansonetti, 2004

Os dois principais elementos de *L.monocytogenes* que promovem a entrada na célula são as proteínas de superfície Internalina A (InlA) e InlB (Hamon et al., 2006).

InlA está covalentemente ligada ao peptidoglicano da membrana celular (Bierne et al., 2002; Ton-That et al., 2004). InlB associa-se com a face externa da membrana bacteriana através de interações eletrostáticas

de seu domínio “GW” com ácidos lipoteicóicos (LTA) (Jonquieres et al., 1999).

O receptor para InlA é a molécula de adesão E-caderina (Mengaud et al., 1996) e para InlB é o receptor Met (Shen et al., 2000).

A E-caderina está localizada predominantemente na superfície basolateral de enterócitos polarizados, e até recentemente não havia certeza de como as bactérias no lúmen intestinal acessavam esse receptor (Mengaud et al., 1996). A *Listeria* interage com a E-caderina durante o processo de extrusão de células apoptóticas, quando a E-caderina fica temporariamente exposta na superfície apical dos enterócitos (Pentecoste et al., 2006). A extrusão celular é um processo homeostático normal no intestino delgado, e ocorre nas extremidades das vilosidades intestinais.

Embora InlB não participe desse processo no epitélio intestinal, essa proteína de virulência é necessária para a infecção eficiente de hepatócitos, e a colonização do fígado em camundongos. (Vazquez-Boland et al., 2001; Khelef et al., 2006).

A fuga de *L.monocytogenes* do vacúolo de entrada (com membrana simples) é devida principalmente à fosfolipase PLcB. (Cossart e Bierne, 2001). A listeriolisina O (LLO) é uma toxina potente, formadora de poro (Gaillard et al., 1987; Bielecki et al., 1990), cuja principal função é permitir o escape de *L.monocytogenes* do vacúolo de dupla membrana que se forma durante a disseminação da bactéria de célula para célula (Cossart e Bierne, 2001), permitindo sua entrada para o citosol. Mutantes de *L.monocytogenes* que não expressam LLO são avirulentos, demonstrando que o escape das

bactérias para o citosol é crítico para o estabelecimento da infecção (Gaillard et al., 1986; Portnoy et al., 1988; Bielecki et al., 1990).

A interação das células de Kupffer com *L. monocytogenes* e neutrófilos parece ser evento crítico durante as primeiras 6–12 h de infecção. Uma fração de *L. monocytogenes* capturada pelo fígado é capaz de escapar da atividade antimicrobiana dos neutrófilos, entrando nos hepatócitos, e multiplicando-se intracelularmente. *L. monocytogenes* tem conjunto notável de fatores de virulência que as habilita a entrar nas células, multiplicarem-se e infectarem outras células (Cossart e Bierne, 2001; Vazquez-Boland, et al., 2001).

Quando as *Listerias* em movimento atingem a membrana plasmática, induzem a formação de protusões contendo a bactéria. O contato entre essas protrusões e as células vizinhas resulta na internalização das bactérias. Esse mecanismo de disseminação intra-tecidual permite que a bactéria passe de célula para célula, escapando das defesas do hospedeiro, contribuindo para sua virulência particularmente em indivíduos imunocomprometidos (Cossart, 2000).

Apesar desses conceitos, sabe-se que os principais determinantes de virulência de *L.monocytogenes*, como as internalinas InlA e InlB (internalização), listeriolisina LLO e fosfolipases PlcA e PlcB (fuga do vacúolo hospedeiro), ActA (permite a formação da cauda da *Listeria* e seu movimento dentro do citoplasma da célula hospedeira), e o principal regulador de virulência PrfA, são conservados em cepas virulentas e em menos virulentas de *Listeria*. A presença desses genes, isoladamente, não é

suficiente para explicar as diferenças na virulência de qualquer cepa em particular (Nelson et al., 2004).

1.1.2. Estratégias de invasão de *Listeria monocytogenes*.

As células epiteliais intestinais (IECs) mantêm uma barreira física contra a flora comensal, embora sítios especializados, como o epitélio associado a folículo (FAE), permitam exposição constante da flora luminal através das células M. Bactérias translocadas e expostas aos macrófagos, células dendríticas (DCs) e linfócitos B são capturadas, mortas, processadas, e apresentadas ao sistema imune (figura 4). Patógenos invasivos de sucesso conseguem levar vantagem na luta para atravessar a barreira epitelial. Uma vez translocadas, as bactérias devem sobreviver ao ataque dos macrófagos. *L. monocytogenes* consegue ultrapassar essa etapa ao escapar do vacúolo fagocítico para o citoplasma, como referido anteriormente.

L. monocytogenes dissemina-se sistemicamente, possivelmente dentro de monócitos circulantes e células dendríticas (Cossart e Sansonetti, 2004)

1.2. *Salmonella* Typhimurium: características morfológicas e epidemiológicas

De acordo com o Manual de Bacteriologia Determinativa de Bergey (Seeliger e Jones, 1986), as bactérias do gênero *Salmonella* são bacilos Gram-negativos, comumente móveis por flagelo, facultativamente anaeróbias e quimioorganotróficas, tendo metabolismo respiratório e

fermentativo ao mesmo tempo. Ocorre em humanos, animais de sangue quente e frio, alimentos e meio ambiente. São bactérias patogênicas para seres humanos e muitas espécies animais causando febre tifóide, febres entéricas, gastroenterites e septicemia.

De acordo com o sistema de classificação taxonômica do CDC, o gênero *Salmonella* contém duas espécies, cada uma com múltiplos sorotipos. As duas espécies são *S. entérica* e *S. bongori*. *S. enterica* está dividida em seis subespécies. As subespécies de *S. entérica* são diferenciadas bioquimicamente e por afinidade genômica. O CDC usa nomes para sorotipos em subespécies I (por exemplo, sorotipos Enteritidis, Typhimurium, Typhi e Cholerasuis) e usa fórmulas antigênicas para sorotipos não nomeados, descritos após 1966 em subespécies II, IV, e VI e em *S. bongori*. Nos sorotipos nomeados, para enfatizar que não são espécies separadas, o nome do sorotipo não deve ser escrito em itálico e a primeira letra deve estar capitalizada. Na primeira citação de um sorotipo o nome do gênero é dado seguido pela palavra “sorotipo” ou a abreviação “sor”. E então o nome do sorotipo (por exemplo, *Salmonella* sorotipo ou sor. Typhimurium). Subseqüentemente, o nome pode ser escrito com o gênero seguido diretamente pelo nome do sorotipo (por exemplo, *Salmonella* Typhimurium ou *S. Typhimurium*) (Brenner et al., 2000).

Salmonella Typhimurium é uma das causas mais comuns da salmonelose no mundo (Vo et al., 2007). Uma característica chave da patogênese de *Salmonella* em humanos e outros animais é a habilidade dessas bactérias em penetrar no epitélio intestinal.

1.2.1. Mecanismos de entrada na célula hospedeira

Fagócitos infectados com *Salmonella* Typhimurium (*S. Typhimurium*) e *Salmonella* Typhi podem entrar na corrente sangüínea dentro de apenas 15 minutos após a ingestão dessas bactérias (Worley et al., 2006).

As *Salmonellas* entram nas células por um mecanismo “trigger” caracterizado por “ruffling” de membrana massivo e rearranjos de actina nos locais de invasão (Cossart e Sansonetti, 2004). Usando um sistema de secreção do tipo III (TTSS) codificado por um locus cromossomal da ilha de patogenicidade 1 (SP-1) (Collazo e Galan, 1997; Darwin e Miller, 1999), um conjunto de proteínas efetoras bacterianas é translocado para o interior das células hospedeiras, manipulando a dinâmica da actina do hospedeiro e das vias de sinalização intracelular, para promover ampla reorganização do citoesqueleto de actina que culmina na entrada da bactéria (Patel e Galan, 2005) (figura 4).

Figura 4 - Mecanismos de entrada do patógeno no interior das células eucarióticas. Mecanismo “trigger”: entrada da bactéria é processada do lado interno da célula hospedeira, pela ação de moléculas efetoras bacterianas injetadas pelo sistema de secreção do tipo III (TTSS)

FONTE: Alonso e Portillo, 2004

S. Typhimurium penetra nos tecidos do organismo a partir da luz intestinal através de duas diferentes vias. Numa das vias, as bactérias acessam os órgãos (principalmente baço e fígado) pelas placas de Peyer, e pelo sistema linfático. Em outra via, os fagócitos carregam bactérias intestinais diretamente para a corrente sanguínea, sem passar pelas placas de Peyer. Após a sua ingestão, as *Salmonellas* são capazes de alcançar órgãos à distância em 15 minutos por essa última via, enquanto pode

demorar 24 horas para atingir os mesmos órgãos pelo sistema linfático (Worley et al., 2006).

A interação da bactéria com seu alvo na célula epitelial ocorre em quatro estágios sucessivos:

1) Estágio de pré-interação: na temperatura de 37°C, as moléculas efetoras estocadas no citoplasma bacteriano estão associadas com chaperonas, cuja principal função é evitar a ativação prematura dessas moléculas e sua degradação proteolítica. Em bactérias crescendo exponencialmente, os TTSS são apropriadamente agrupados, mas a secreção de proteínas efetoras só ocorrerá quando a bactéria estabelecer contato com sua célula alvo.

2) Estágio de interação: esse estágio inclui eventos complexos levando à formação de uma plataforma de sinalização. Um evento de reconhecimento, provavelmente acontece na extremidade do TTSS, ativando o processo secretório via sinal retroativo, possivelmente envolvendo uma adenosina trifosfatase no corpo basal do TTSS. (figura 5)

3) Formação de bolsa macropinocítica: nesse estágio há rearranjos maciços, localizados na superfície celular, caracterizados pela formação de estruturas filopodiais e lamelipodiais complexas. Os rearranjos do citoesqueleto de actina amplamente contribuem para a formação do ponto de entrada.

4) Despolimerização da actina e fechamento da bolsa de macropinocitose: (Cossart e Sansonetti, 2004).

Figura 5 - Sistema de secreção do tipo III de *S. Typhimurium*. (A) Micrografias de *S. Typhimurium* submetida a choque osmótico com complexos em agulha visíveis no envelope bacteriano. (B) Micrografia dos complexos em agulha purificados. (C) Uma representação esquemática do complexo em agulha de *S. Typhimurium* e seus componentes supostos. A localização dos diferentes componentes é hipotética

FONTE: Cossart e Sansonetti, 2004

Figura 6 - Vias de invasão da *Salmonella* pelo epitélio intestinal. Destaque para células M, migração transepitelial e passagem pelas células dendríticas
FONTE: Cossart e Sansonetti, 2004

1.2.2. Estratégias de invasão de *Salmonella Typhimurium*.

Como referido anteriormente, as células epiteliais intestinais (IECs) mantêm uma barreira física contra a flora intestinal, e as células M permitem a exposição dessa flora ao sistema imune. Bactérias translocadas por essa via serão expostas aos macrófagos, células dendríticas (DCs) e linfócitos B (figura 6). Uma vez translocadas, as bactérias devem sobreviver ao ataque dos macrófagos. *S. Typhimurium* remodela seus fagossomos, evitando sua transição a lisossomos, e criando um nicho intracelular que permite sua eficiente replicação. Ao cruzar a barreira epitelial e evitar a ameaça dos

fagócitos, as *Salmonellas* podem entrar nas IECs através do seu pólo basolateral, de maneira TTSS - dependente. Rotas alternativas de invasão envolvem as IECs diretamente. *Salmonellas* são capazes de deslocar o citoesqueleto da borda em escova, e causar um “ruffling” de entrada apical. Um terceiro processo de translocação pode envolver DCs deslocando-se entre IECs, ou enviando pseudópodes para capturar bactérias luminais e retrair-se numa posição subepitelial. *Salmonellas* são capazes de translocar dessa forma, seguindo-se a difusão sistêmica de DCs carregadas de bactérias (Cossart e Sansonetti, 2004).

1.3. Interação entre bactérias e células hospedeiras: liberação de citocinas

A interação entre bactérias e células hospedeiras, invariavelmente, resulta na liberação de citocinas, constituindo parte da resposta imune inata.

McCormick et al. (1993) relataram que a adesão de *Salmonella* Typhimurium às células epiteliais intestinais humanas, induz liberação de IL-8. Da mesma forma Eckmann et al. (1993) mostraram que a invasão de células epiteliais por *Salmonella dublin*, *Yersinia enterocolitica*, *Shigella dysenteriae*, e *Listeria monocytogenes*, induz a liberação dessa mesma citocina.

Determinadas linhagens epiteliais celulares secretam citocinas proinflamatórias IL-8, proteína quimiotática 1 do monócito (MCP-1), GM-CSF, e TNF-alfa em resposta à invasão por *Salmonella dublin*, *Shigella*

dysenteriae, *Y. enterocolitica*, *Listeria monocytogenes*, e *E. coli* enteroinvasora (Jung et al., 1995).

O TNF-alfa é uma citocina importante para os sistemas de defesa do hospedeiro, com funções biológicas variadas e mecanismo de ação complexo. Essa citocina confere resistência para certos tipos de infecção, causando complicações patológicas de forma contraditória, como a morte de células teciduais (Fiers, 1991)

O TNF-alfa desempenha vários papéis terapêuticos dentro do organismo, incluindo imunoestimulação, resistência a agentes infecciosos, resistência a tumores (Vilcek e Lee, 1991), regulação do sono (Krueger et al., 1998), e desenvolvimento embrionário (Wride e Sanders, 1995). Por outro lado, infecções se tornam mais patogênicas ou fatais devido à circulação dessa citocina (Fiers, 1991). Entretanto, o papel maior do TNF-alfa parece ser de mediador na resistência contra infecções, através da ativação de neutrófilos e plaquetas, aumento da capacidade de matar do macrófago/célula NK, e estímulo do sistema imune (Fiers, 1991).

Luo et al (1993) relataram que *E. coli*, *Salmonella* Typhimurium, e *Shigella flexneri* podem ligar-se ao TNF-alfa. Embora a ligação dessa citocina às bactérias gram-positivas (*Listeria monocytogenes*, *S. aureus*, e *Streptococcus mitis*) também fosse observada, a quantidade ligada era muito menor do que aquela vista em organismos gram-negativos. A ligação do TNF-alfa com bactérias levou a uma maior captura do complexo citocina-bactéria por macrófagos, sendo benéfica ao hospedeiro. Por outro lado, a

capacidade invasiva aumentada desse complexo, permite às bactérias escapar dos mecanismos de defesa do hospedeiro.

Vários membros da superfamília de receptores de TNF I e II possuem "domínios de morte" intracelulares de interação protéica, cada um consistindo de 65–80 aminoácidos, que participam da morte celular por apoptose mediada por TNF-alfa. Caspases são recrutadas pelo receptor ativado (juntamente com outras moléculas sinalizadoras), por proteínas adaptadoras tais como TRADD e FADD.

1.4. Apoptose e o equilíbrio homeostático da célula: mediação por TNF-alfa

Apoptose, termo que surgiu no século 19 e foi utilizado pela primeira vez em 1972 por Kerr, Wyllie, e Currie, refere-se a uma forma específica de morte celular programada. A homeostase dos tecidos é mantida por um delicado balanço entre proliferação e morte celular. O distúrbio desse balanço freqüentemente leva ao acúmulo patológico de células, como verificado no câncer. Durante a última década a biologia celular, assim como a pesquisa em oncologia, tem concentrado atenção no processo mais tardio da morte celular programada, ou apoptose. A compreensão dos mecanismos básicos que formam a base da apoptose oferecerão novos alvos para o tratamento das doenças, em que a apoptose está presente (Engeland et al., 1998).

A apoptose mediada por TNF-alfa participa do desenvolvimento embrionário normal (Wride e Sanders, 1995). O TNF pode induzir morte

celular necrótica ou apoptótica (Beyaert e Fiers, 1994). A necrose é caracterizada por inchaço celular, destruição de organelas e lise celular. A apoptose, por sua vez, é processo bioquimicamente conservado de morte celular, com características morfológicas distintas (Steller, 1995). Esse tipo de morte celular é caracterizado por encolhimento da célula, formação de corpos apoptóticos (que serão fagocitados pelas células circulantes), e formação de fragmentação de DNA internucleosomal (tabela 1). A apoptose por TNF-alfa ocorre através da via sinalizadora do receptor TNFR-1 (Grell et al., 1999). Muitas proteínas adaptadoras estão envolvidas nas vias de sinalização que iniciam a apoptose (Baker e Reddy, 1996, 1998; Yuan, 1997). Em contrapartida, o TNF-alfa pode também preservar a sobrevivência da célula através da ativação de NF- κ B (Bazzoni e Beutler, 1996; Orlinick e Chao, 1998).

Tabela 1 - Alterações na morfologia celular e eventos moleculares durante a apoptose

A. Alterações morfológicas
Encolhimento das células / tamanho diminuído
Mudança na forma da célula (esférica)
Condensação da cromatina nuclear
Perda da estrutura nuclear reconhecida visualmente
Hipercromia do DNA
Segregação do nucléolo
Dissolução do envelope nuclear
Fragmentação nuclear
Condensação do citoplasma
Perda de estruturas da superfície celular (pseudopodia, microvilli)
Formação e desmembramento dos corpos apoptóticos
Descolamento das células em cultura
Fagocitose das células apoptóticas restantes
B. Principais eventos bioquímicos e moleculares da apoptose
Proporção aumentada de membros pro-apoptóticos versus anti-apoptóticos da família Bcl-2
Mudanças na mitocôndria
Queda ou colapso do potencial transmembrana
Perda do citocromo c e outros constituintes mitocondriais
“Stress” oxidativo (formação de ROI)
Aumento do Ca^{2+} intracelular
Desidratação da célula
Perda da assimetria em fosfolípidos da membrana plasmática / exposição de fosfatidilserina
Ativação da cascata das caspases
Proteólise dos substratos de morte (PARP)
Ativação das proteases da serina
Degradação da actina-F e outras proteínas
Perda da estabilidade da dupla hélice do DNA (susceptibilidade a desnaturação)
Aparecimento de secções de DNA de cadeia única
Degradação endonucleolítica do DNA
Fragmentos de 50-300 kb (DNA)
Clivagem do DNA internucleosomal
Ativação da transglutaminase

FONTE: Darzynkiewicz, Z et al., 2004

Uma célula é continuamente exposta a múltiplos estímulos opostos de morte e sobrevivência. Vários desencadeantes da apoptose são conhecidos, como a remoção dos fatores de crescimento, lesão do DNA, ligação do ligante Fas, aplicação de agentes quimioterapêuticos, etc (Engeland et al., 1998). Embora esses estímulos iniciem uma cascata de eventos que finalmente resulta na morte celular (figura 7), eles diferem no intervalo entre a exposição ao estímulo e o surgimento dos primeiros sinais morfológicos da apoptose. A duração dessa fase depende do tipo de célula, do tipo de estímulo, e das condições de crescimento da célula (Engeland et al., 1998).

A natureza assincrônica da morte apoptótica em populações celulares é devida, principalmente, à duração altamente variável da fase de iniciação. Segundo estudos de videomicroscopia de cultura celular, as mudanças morfológicas dinâmicas sempre tomam lugar em menos de 2 horas (McCarthy et al., 1997; Messam e Pittman, 1998). O chamado “ponto sem retorno” ocorre várias horas antes do aparecimento do principal evento morfológico (Messam e Pittman, 1998; Brunet et al., 1998). A duração da morte celular apoptótica tem sido estimada entre 6 e 24 horas *in vivo*, embora possa variar dependendo do tipo celular (Kerr, et al., 1972; Gavrieli, et al., 1992).

Há três fases funcionalmente distintas da apoptose: a) fase iniciadora: é a mais heterogênea das três, na qual os sinais indutores de morte como o ligante Fas, o TNF-alfa, o dano ao DNA, entre outros, podem induzir a célula a preparar-se para a sua morte; b) fase efetora: essa fase é caracterizada pela ativação das caspases, formando uma cascata amplificadora de sinais

de morte. Os sinais de morte provavelmente atingem a mitocôndria que subseqüentemente libera o fator indutor de apoptose (AIF), uma protease que é inibida por Z-VAD.fmk justamente como as caspases. Esse evento marca o “ponto sem retorno”; c) fase de degradação: nessa fase a morte da célula, do seu citoplasma e núcleo, ocorre de forma irreversível (Reutelingsperger e Heerde, 1997).

Figura 7 - Visão esquemática da apoptose em hepatócitos: a apoptose pode ser iniciada via liberação de TNF-alfa por células de Kupffer, levando à ativação de JNK. Células NK e T NK liberam Fas ou TRAIL, e interferon gama (regulador da liberação de Fas ou TRAIL), levando à apoptose do hepatócito. Células estreladas podem ser diretamente ativadas por corpos apoptóticos, secretando colágeno do tipo I, e levando à fibrose do fígado.

FONTE: Malhi e Gores, 2008

Segundo Suzuki et al (2001) o primeiro evento da cascata apoptótica, é a perda do potencial da membrana da mitocôndria, permitindo a saída do citocromo c. Em seguida inicia-se (figura 8) o processo de translocação da fosfatidilserina (PS), a expressão das proteínas Bax e ativação da caspase 3 quase que ao mesmo tempo, finalizando com a fragmentação do DNA e as alterações ultraestruturais, observadas através de microscopia eletrônica.

Figura 8 – Cascata apoptótica
FONTE: Suzuki et al, 2001

1.5. Relação das bactérias com a apoptose

L. monocytogenes induz apoptose de hepatócitos *in vitro* e *in vivo* (Rogers, et al., 1996). Desde que o hepatócito é o maior local de replicação de *L. monocytogenes* no fígado, acredita-se que esse processo permita a remoção de bactérias intracelulares, antes da chegada de células T citotóxicas específicas. Concomitante com a sua morte por apoptose, os hepatócitos infectados com *L. monocytogenes* liberam citocinas proinflamatórias, que atraem e ativam neutrófilos contra a bactéria. Assim, a apoptose pode servir como mecanismo de defesa, pelo qual o hospedeiro

diretamente elimina células infectadas, e inicia a resposta inflamatória. Por outro lado, o processo apoptótico pode também ser exportado pelos patógenos bacterianos para eliminar efetores imunes. Nesse sentido, *L. monocytogenes* induz a apoptose de células dendríticas (Guzman, Domann, et al., 1996), apresentadoras de antígeno. Patógenos intracelulares também podem se beneficiar ao inibir a apoptose de células infectadas, estratégia que tem sido documentada com agentes virais (Spriggs, 1996). Também macrófagos infectados com *L. monocytogenes* não sofrem apoptose rapidamente, mas morrem de necrose tardia depois de extensa multiplicação bacteriana no citosol (Barsig e Kaufmann, 1997).

Quanto à *S. Typhimurium*, sabemos que replica e sobrevive em macrófagos derivados do baço. Essa bactéria passa a ser citotóxica apenas 14h após a invasão celular (Monack et al., 1996). *S. Typhimurium* invasiva causa morte celular programada ou apoptose de macrófagos (Monack et al., 1996, Forsberg et al, 2003).

1.6. Apoptose: exposição da Fosfatidilserina (PS) da membrana plasmática da célula e ligação à anexina:

As células viáveis mantêm uma distribuição assimétrica de diferentes fosfolípides entre as camadas interna e externa da membrana plasmática (Bretscher, 1972). Isso é particularmente verdadeiro para fosfolípides que contêm colina, como a fosfatidilcolina e a esfingomiélin, que estão primariamente localizados na camada externa das células viáveis, bem como para os aminofosfolípides fosfatidiletanolamina e fosfatidilserina (PS),

que são encontrados na face citoplasmática. Essa assimetria da membrana plasmática foi descrita inicialmente para eritrócitos e plaquetas (Op den Kamp, 1979; Schroit e Zwaai, 1991), e mais tarde foi encontrada também nas células nucleadas (Devaux, 1991; Zachowski, 1993).

A assimetria lipídica da membrana plasmática em células viáveis (figura 9) pode ser mantida pelas flipases, proteínas de membrana que facilitam a translocação das moléculas de lípidos de uma face para outra (Higgins, 1994). Seigneuret e Devaux (1984) foram os primeiros a demonstrar que a membrana dos eritrócitos é capaz de translocar especificamente aminofosfolípidos de uma face à outra. Tal característica foi também encontrada mais tarde nas membranas de plaquetas (Comfurius, 1990; Bever et al., 1982, 1983) e de células nucleadas (Martin e Pagano, 1987; Zachowski et al., 1987). Connor et al. (1992, 1994) mostraram evidências para a dependência de Mg^{2+} /ATP nesse processo.

A exposição de PS na superfície celular tem importância na catalização da coagulação por plaquetas ativadas, e na eliminação de eritrócitos senescentes através do sistema retículo-endotelial (Chancerelle et al., 1994). Fadok et al. (1992, 1993) demonstraram que os leucócitos expõem PS na face externa da membrana plasmática durante a apoptose. Nesse caso, a superfície celular expõe as funções de PS como uma marca para o reconhecimento específico por macrófagos, e para a fagocitose da célula que está morrendo.

As escramblases, enzimas responsáveis pela translocação para dentro e para fora da PS, por arrastamento de aminofosfolípidos sobre a face

interna e externa da membrana, são responsáveis pela exposição de PS em plaquetas e eritrócitos (Diaz e Schroit, 1996; Zwaal e Schroit, 1997). A fodrina (espectrina não eritróide) atua na manutenção da composição fosfolípídica assimétrica da membrana citoplasmática, ancorando PS na membrana. Como uma consequência da degradação da fodrina, por caspases, a PS seria exposta durante a apoptose (Vanags et al, 1996).

Como referido acima, a fosfatidilserina (PS) pertence ao grupo dos aminofosfolípidos, e carrega um radical fosfoerina, que dá a esse fosfolípido uma carga negativa no pH 7,4. Tem sido aceito que a assimetria da PS é ubíqua. Em 1984, Seigneuret e Devaux demonstraram que as células usam energia para gerar e manter a assimetria fosfolípídica de suas membranas (Seigneuret e Devaux, 1984). Várias proteínas associadas à membrana são diretamente responsáveis pela distribuição das espécies fosfolípídicas entre as duas faces da membrana (Diaz e Schroit, 1996). Essas proteínas transportam PS da face externa para a interna (aminofosfolípido translocase) ou vice-versa (floppase), ou bidirecionalmente (escramblase) (Zwaal e Schroit, 1997) (figura 10). Sob condições normais, a atividade da aminofosfolípido translocase domina, gerando o predomínio de PS na porção interna da membrana.

Os macrófagos teciduais reconhecem e fagocitam células com PS exposto na membrana externa, através de processo mediado por receptor. Várias células tumorais exibem assimetria de fosfolípido aberrante com PS na superfície celular, que é reconhecida por macrófagos derivados de monócitos (Connor et al, 1994).

As investigações quanto à exposição de PS na face externa da membrana das células assumiram grande importância pela descoberta de que a anexina V liga-se especificamente à PS na presença de cálcio (Andree et al., 1990; Tait et al., 1989). A anexina V foi descrita inicialmente por Bohn et al (1979) que isolaram a proteína da placenta humana e chamaram-na de proteína placentária 4 (PP4), e por Reutelingsperger et al. (1985), que a isolaram do cordão umbilical e chamaram-na de anticoagulante vascular a, em virtude de sua atividade anticoagulante. Após clonagem e seqüenciamento do cDNA da anexina V humana, a proteína obteve esse nome por causa de sua homologia com a família das proteínas anexina (Iwasaki et al., 1987; Kaplan et al., 1988; Maurer et al., 1988).

Baseado na noção dada por Fadok et al. (1992) de que as células viáveis mantêm PS predominantemente localizado na face interna da membrana celular, Koopman et al. (1994) esquematizaram um método de detecção da apoptose baseado na anxA5 marcada com fluorescência. (Martin et al., 1995; Vermes et al., 1995; Homburg et al., 1995).

Figura 9 - Representação esquemática da perda da assimetria da membrana lipídica durante a apoptose. Células vivas mantêm uma composição de dupla membrana lipídica estritamente assimétrica, com resíduos de PS (círculos vermelhos) voltados para o citosol. Durante a apoptose essas moléculas migram para a face externa da membrana. **FONTE:** Engeland et al., 1998

Figura 10 - Representação esquemática da regulação da assimetria de PS da membrana plasmática durante a vida e morte, e o papel da anexina V se PS estiver exposta na superfície das células **FONTE:** Reutelingsperger e Heerde, 1997

A anexina V pode ser conjugada a fluorocromos como o iodeto de propídeo (PI). Esse formato tem alta afinidade por PS, servindo como um probe sensível para análise de células que estão em apoptose, por citometria de fluxo. Desde que a externalização de PS ocorre em estágios precoces da apoptose, a coloração anexina V-FITC (isotiocianato de fluoresceína) pode identificar a apoptose em estágios bem iniciais, superando métodos de detecção de apoptose baseados em mudanças nucleares, tais como a fragmentação do DNA. A coloração por anexina V precede a perda da integridade da membrana, que acompanha os estágios mais tardios da morte celular, nas mortes por apoptose e necrose. Conseqüentemente, a coloração com anexina V-FITC é usada em conjunto com um corante vital, como o iodeto de propídeo, para permitir ao investigador identificar células apoptóticas precoces (anexina V-FITC positiva, PI negativo). Por exemplo, células viáveis são anexina V-FITC e PI positivos. Entretanto, esse tipo de ensaio não distingue, intrinsecamente, entre células que já estejam em apoptose e aquelas que tinham morrido como resultado da via necrótica, porque em ambas as situações as células mortas serão coradas com anexina-FITC e PI. No entanto, quando a apoptose é medida além do tempo, as células podem ser freqüentemente traçadas de anexina V-FITC e PI negativos (viável, ou apoptose não mensurável), a anexina V-FITC positiva e PI negativa (apoptose precoce, integridade da membrana está presente) e finalmente a anexina V-FITC e PI positivo (estágio final da apoptose e morte). O movimento das células

através desses três estágios sugere apoptose. (Raynal e Pollard, 1994; Vermes et al., 1995; Martin et al., 1995; Koopman et al., 1994; Homburg et al., 1995; Andree et al., 1990).

Através das metodologias para detecção de apoptose utilizadas nesse trabalho (TUNEL e anexina), procuramos estudar as várias fases do fenômeno de morte celular. Os estímulos apoptóticos que usamos foram as bactérias *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* Typhimurium, bem como a estaurosporina.

No contexto das considerações acima, esse estudo se propõe a estudar a invasão celular (hepatócitos cultivados), utilizando microrganismos patogênicos específicos (*Listeria monocytogenes* e *Salmonella* Typhimurium). Essa pesquisa procura trazer novos conhecimentos sobre a ação intracelular dessas bactérias, e sua influência na produção de citocinas e na indução de morte celular.

2. OBJETIVOS

1. Analisar o comportamento dos hepatócitos agredidos por *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* Typhimurium através de sua alteração morfológica, empregando recursos de microscopia óptica (pela coloração de hematoxilina-eosina) e eletrônica.

2. Detectar a presença de TNF-alfa no sobrenadante da cultura de hepatócitos, bem como a sua cinética de liberação ao longo do tempo, após invasão das células por *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* Typhimurium, através de técnica de ELISA.

3. Pesquisar e quantificar a presença da morte celular por apoptose em hepatócitos de rato invadidos por *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* Typhimurium, através da técnica de TUNEL por Citometria de Fluxo.

4. Pesquisar e quantificar a presença da morte celular por apoptose em hepatócitos de rato invadidos por *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* Typhimurium, através da técnica de anexina por Citometria de Fluxo.

3. MÉTODOS

O presente estudo foi conduzido no Laboratório de Bacteriologia (LIM-54) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

3.1. Cultura primária de hepatócitos de rato

Foram utilizados ratos recém-nascidos de até uma semana, fêmeas, Wistar, em número de 15 a 20 por ensaio, fornecidos pelo Biotério Central da FMUSP. O

Os animais foram anestesiados com éter e operados com técnica asséptica sob fluxo laminar de ar. Os fígados foram retirados com auxílio de pinça fina e transferidos a um recipiente contendo solução salina tamponada, sem cálcio e magnésio (PBSa). Após remoção dos órgãos, o material foi cortado com tesoura fina por 10 minutos e o conjunto transferido para tubo-cone de plástico (Falcon). A seguir, foi efetuada centrifugação em baixa rotação (700 rpm ou 50g) durante 5 minutos, em centrífuga refrigerada (Eppendorf). Após desprezar o sobrenadante, o material foi incubado com a enzima collagenase 0,2% (Sigma) por 10 minutos em estufa a 37°C (técnica de dispersão celular por via enzimática “*in vitro*” desenvolvida em nosso laboratório). Após essa etapa, foi adicionada solução de PBSa + soro fetal

bovino (SFB) a 20% ao tubo-cone, e realizada nova centrifugação do material em baixa rotação, sendo desprezado o sobrenadante a seguir. Essa operação foi repetida por três vezes para lavagem do conjunto. O material foi, então, transferido para garrafas de cultura de plástico (Nunc) previamente recobertas em sua base (face interna) com matriz de laminina (Sigma) na concentração de 50µg/mL.

Após a transferência das células para as garrafas de cultura, foi acrescentado o meio de cultura Williams E (Sigma) enriquecido com os seguintes suplementos: insulina (Biobrás) 10^{-8} M, glucagon (Sigma) 10^{-9} M, hormônio de crescimento humano (GH) (Sigma) 10µU/mL, fator de crescimento epidermal (EGF) (Sigma) 10ng/mL, ampicilina sódica (HCFMUSP) 100µg/mL, estreptomicina (HCFMUSP) 100µg/mL e anfotericina B (HCFMUSP) 5µg/mL. O conjunto de suplementos foi padronizado em Tese de Doutorado realizada em nosso laboratório (Andrade Júnior, 1996), e mostrou ser o mais adequado para sustentar hepatócitos de rato em cultura e induzir a sua proliferação “*in vitro*”. No momento da cultura (dia 1), adicionou-se SFB (Cultilab) 1% no volume de 5% em relação ao volume final de meio de cultura nas garrafas (3mL). A atmosfera final das garrafas era composta por 95% de ar e 5% de CO₂. Em seguida, as garrafas foram fechadas e as células colocadas em estufa de CO₂ (Sanyo) para incubação por 24 horas a 37°C. Após esse período (dia 2), o meio de cultura foi trocado com técnica asséptica, sendo adicionada hidrocortisona (Sigma) na concentração de 5×10^{-8} M. O SFB foi acrescentado na concentração final de 2% a partir do dia 2 de cultura. O meio de cultura

Williams E foi novamente trocado nos dias 4 e 5, com a mesma composição do dia 2 referida anteriormente (Andrade Júnior, 1996).

A viabilidade celular da cultura primária de hepatócitos foi medida pela técnica de exclusão do corante Trypan-Blue a 0,4%. Esse corante penetra somente nas células não viáveis, que foram coradas em azul. As células viáveis (não coradas) e não viáveis (coradas) foram contadas em câmara de Neubauer. O cálculo da viabilidade celular foi realizado no dia 1 para avaliação da qualidade técnica de cultura empregada e também no dia 5, antes e após o ensaio experimental.

A confirmação do cultivo da célula hepática no dia 5 foi efetuada por técnica de imunohistoquímica através do método da Streptavidina-Biotina-Peroxidase. Foi realizada também a determinação das isoenzimas da enzima desidrogenase láctica (DHL), presentes no sobrenadante das garrafas, pela técnica de eletroforese em fitas de acetato. A dosagem de albumina no sobrenadante foi feita por técnica de nefelometria em aparelho "Nephelometer Analyzer", no dia 8 de cultura.

Foi realizado teste imunohistoquímico com as células cultivadas sobre lâmina de vidro, pela mesma técnica empregada para o cultivo das garrafas, através do uso de anticorpos anti-citoqueratina de alto e baixo peso molecular, pelo método da Streptavidina-Biotina-Peroxidase.

3.2. Cultura de bactérias

As bactérias *Listeria monocytogenes* sorotipos 4a (ATCC 19114), 4b (ATCC 19115) e 1/2a, e *Salmonella* Typhimurium (PROBAC), foram

cultivadas em meios BHI (brain heart infusion) (Merck) e ágar sangue respectivamente, por 24h a 37°C (Eckmann et al., 1993). Posteriormente, uma colônia de cada cepa bacteriana foi semeada em 10 mL de meio caldo BHI a 37°C até a fase log de crescimento característica para cada tipo bacteriano.

3.3. Curvas de crescimento bacteriano

As cepas de *L. monocytogenes* e *S. Typhimurium* foram inoculadas em 10mL de caldo BHI a 37°C sob agitação de 200 rpm durante 24 horas. No dia seguinte realizou-se a diluição das suspensões bacterianas na proporção 1:100 em 200mL de caldo BHI. Esses frascos foram incubados a 37°C sob agitação de 200 rpm. A cada hora, alíquotas de 1mL foram coletadas em cubetas de poliestireno para realizar-se a leitura em espectrofotômetro (Shimadzu), determinando a absorbância das amostras.

Esse mesmo procedimento foi realizado pelo período total de 9 horas, momento em que todas as cepas já se encontravam na fase estacionária.

3.4. Atividade hemolítica e fosfolipídica de *Listeria monocytogenes*

As cepas de *L. monocytogenes* foram semeadas em placas contendo ágar sangue de carneiro a 5% (Biotério Boa Vista), ágar BHI contendo 0,5% de solução de gema de ovo, e ágar BHI contendo 0,5% de solução de gema de ovo mais 5% de carvão ativado (Merck, Alemanha). Todas as placas foram incubadas a 37°C por 24 horas (Ermolaeva et al., 2003). Foi utilizado

como controle positivo da reação a cepa *Streptococcus* β hemolítico (PROBAC).

Para observar as atividades, hemolítica e fosfolipídica, das cepas de *L. monocytogenes in vitro*, realizou-se o estriamento das cepas em ágar sangue, ágar BHI enriquecido de lecitina e ágar BHI com lecitina suplementado com carvão ativado.

3.5. Ensaio de invasão bacteriana em hepatócitos

O inóculo bacteriano foi lavado 3 vezes em PBS (pH 7,2) e centrifugado a 2500 rpm por 5 minutos. Posteriormente, foram feitas diluições desse inóculo em meio RPMI-1640 (Sigma) sem antibióticos. Essas alíquotas foram aplicadas em cada garrafa contendo a cultura de células, incubando-se a 37°C por no mínimo 2 horas, para permitir a entrada bacteriana (Eckmann et al., 1993).

Foram utilizadas concentrações bacterianas proporcionais ao número de células, denominadas “multiplicidade de infecção” (MOI), à saber: MOI 0,5 (5×10^5 bactérias : 1×10^6 células), MOI 5 (5×10^6 bactérias : 1×10^6 células), MOI 50 (5×10^7 bactérias : 1×10^6 células), MOI 500 (5×10^8 bactérias : 1×10^6 células), MOI 5000 (5×10^9 bactérias : 1×10^6 células), e MOI 50000 (5×10^{10} bactérias : 1×10^6 células) (Santos et al., 2005).

Após 6 períodos de incubação (1h, 2h, 3h, 4h, 5h e 6h), os sobrenadantes foram retirados para posterior dosagem de TNF-alfa, e armazenados em tubos “criovial” a -70°C (Wood et al, 1993). A seguir as garrafas foram lavadas com PBS, aplicando-se 0,5mL de tripsina-EDTA

(Cultilab) em cada garrafa para destacar as células (Gianella et al, 1973), incubando o conjunto a 37°C por 2 minutos. As células foram recolhidas em tubo cone contendo 5mL de RPMI-1640 e 10% de SFB, e os tubos foram centrifugados à 2500 rpm por 5 minutos.

Para determinar o número de bactérias invasoras, os “pellets” foram lisados com solução gelada de Triton X-100 (Sigma) a 0,1% e plaqueados em diluições seriadas, incubando-se em seguida a 37°C por 24 horas, para determinar a população de bactérias intracelulares viáveis.

3.6. Detecção de TNF-alfa por ELISA

A quantificação do TNF-alfa liberado nos sobrenadantes das culturas de hepatócitos, invadidos por bactérias, foi feita através de ELISA para TNF-alfa de rato (Biotrak ELISA, Amersham). Nesse método foram aplicados 50µL de tampão de pré-tratamento, em cada "well" da placa fornecida com o kit. Em seguida foram aplicados 50µL dos controles e das amostras em duplicata. A placa foi incubada à temperatura ambiente (20°-25°C) por 1 hora e, após esse período, foi lavada 3 vezes com solução tampão. A seguir foram adicionados 50µL de anticorpo biotinilado em cada “well”. A placa foi incubada à temperatura ambiente por 1 hora, e após esse período foi lavada por três vezes com solução tampão. Aplicaram-se 100µL de Streptavidina-HRP em cada “well”. A placa era, então, incubada à temperatura ambiente por 30 minutos. Após esse período foi efetuada nova lavagem da placa por três vezes com solução tampão. Em seguida foram aplicados 100µL de

Substrato TMB em cada “well”, e a placa era incubada no escuro por 10 minutos. Por fim a reação foi bloqueada aplicando 100µL de “solução stop” em cada “well”. A absorbância foi medida em aparelho leitor de ELISA a 450 nm e 550 nm (figura 11). (GE)

Figura 11 - Procedimento para dosagem de TNF-alfa por ELISA.

3.7. Análise da morfologia celular por coloração de hematoxilina-eosina

Após o cultivo dos hepatócitos em lamínulas, essas foram lavadas com duas vezes com PBS. As lamínulas foram fixadas em metanol (Merck) por 1 a 2 minutos. Posteriormente, foram hidratadas partindo-se do álcool 70 até água destilada, 5 minutos cada etapa. Em seguida, as lamínulas foram incubadas com hematoxilina (Sigma) por 15 a 20 minutos. Foram lavadas em água corrente e incubadas com eosina (Sigma) por 15 a 20 minutos. As lamínulas foram lavadas com água destilada e desidratadas a partir do álcool 50 até 100. Ao final as lamínulas foram mergulhadas em xilol, e montadas com Bálsamo do Canadá sobre lâmina.

3.8. Análise da morfologia celular por Microscopia Eletrônica

Os reagentes usados nessa técnica foram cedidos pelo Laboratório de Microscopia Eletrônica da FMUSP.

O “pellet” de células foi lavado duas vezes com PBS, tratado com 200 µL de glutaraldeído a 2,5% em tampão fosfato (0,1M, pH 7,3), para fixar as estruturas das células, e incubado por 2 horas a 4°C. Posteriormente o “pellet” foi lavado 3 vezes com PBS, tratado com 200µL de tetróxido de ósmio a 2% em tampão s-collidina (0,1M, pH 7,4) e incubado por 2 horas a 4°C. Em seguida o “pellet” foi lavado quatro vezes com PBS, tratado com 200µL de uranila e incubado “overnight” a 4°C.

No dia seguinte o “pellet” era lavado três vezes com PBS e duas vezes com solução fisiológica contendo sacarose. Em seguida era desidratado, partindo-se do álcool 50 até 100, 5 minutos cada fase, e incubado por 5 minutos com acetona. Posteriormente o “pellet” foi mergulhado em solução 1:1 contendo acetona 100% e Epon Polybed 812+resina Araldite 502 por 3 horas. Em seguida essa solução foi trocada pela resina pura, e incubada por três dias a 65°C. Ao final o material foi reincluído, para que fossem realizados os cortes semifinos em micrótomo, e análise em microscópio eletrônico.

3.9. Detecção de apoptose por coloração TUNEL através de citometria de fluxo

Usamos nesse método o kit de detecção de fragmentação do DNA FragEL (Cat. Nº QIA39, Calbiochem). Esse kit é um sistema não isotópico para marcação de quebras de DNA em núcleos apoptóticos, em preparados celulares. A detecção e análise do marcador são possíveis por citometria de fluxo ou microscopia de fluorescência. Nesse trabalho utilizamos a citometria de fluxo.

As endonucleases apoptóticas não apenas afetam o DNA celular pela produção do padrão de bandas característico da apoptose, mas também geram grupos 3'-OH livres nas extremidades do DNA. Por esse método são marcados esses grupos hidroxil com deoxinucleotídeos conjugados a fluoresceína. A transferase deoxinucleotidil terminal (TdT) liga-se às extremidades 3'-OH expostas, dos fragmentos de DNA gerados em resposta

a sinais apoptóticos, catalisando a adição de deoxinucleotídeos marcados ou não com fluoresceína.

As células destacadas das garrafas de cultura foram centrifugadas a 1000 rpm por 5 minutos a 4°C. O meio de cultura foi totalmente removido. As células foram ressuspensas em formaldeído a 4% em PBS numa densidade de 1×10^6 células/mL, e incubadas à temperatura ambiente por 10 minutos. A seguir, as células foram centrifugadas a 1000 rpm por 5 minutos a 4° C para a retirada do formaldeído, e ressuspensas na mesma concentração de etanol a 80%. Posteriormente procedeu-se ao processo de rehidratação das células fixadas. Nessa etapa era transferido 1 mL das células fixadas (em 1×10^6 células/mL) a um tubo cone, e centrifugado o conjunto a 1000 rpm por 5 minutos, à temperatura ambiente, para a retirada do etanol. As células eram então ressuspensas em 200 µL de 1xTBS, e incubadas por 10-15 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, as células foram novamente centrifugadas a 1000 rpm por 5 minutos à temperatura ambiente, para remoção do TBS.

Na etapa de permeabilização, as células eram ressuspensas em 100µL de Proteinase K (20µg/mL), e incubadas à temperatura ambiente por 5 minutos. As células foram centrifugadas a 1000 rpm por 5 minutos à temperatura ambiente, para remoção da proteinase K.

Para o equilíbrio e marcação, as células foram ressuspensas em 100µL de tampão 1xTdT Equilíbrio e incubadas à temperatura ambiente por 10-30 minutos. O tampão era removido por centrifugação, e a seguir foram aplicados 60µL da reação de mistura (TUNEL “Enzyme”+TUNEL “Labelling”)

em cada “pellet” de células. O conjunto era incubado a 37°C por 1-1,5 h no escuro.

Na seqüência as células eram novamente centrifugadas para remoção do tampão de reação, e lavadas duas vezes com 200µL de 1xTBS. Ao final as células eram ressuspensas em 0,5 mL de TBS. A análise final foi feita em citômetro de fluxo equipado com fonte de íon laser argônio de 488 nm (FACSCalibur, BD).

3.10. Detecção de apoptose com Anexina V marcada com FITC através de citometria de fluxo

Usamos o kit para detecção de apoptose através de anexina V marcada com FITC (isotiocianato de fluoresceína) da BD Pharmingen.

A anexina V marcada com fluoresceína é um probe para identificação de células apoptóticas (Martin et al., 1995; Koopman et al., 1994; Homburg et al., 1995). Essa substância se liga a superfícies fosfolipídicas carregadas negativamente, com especificidade mais alta para a fosfatidilserina, do que para outros fosfolipídios. Concentrações definidas de cálcio e sais são necessárias para a ligação de anexina V-FITC, como descrito no protocolo.

Nesse método, as células foram lavadas duas vezes com PBS gelado e ressuspensas em tampão de ligação na concentração 1×10^6 células/mL. Em seguida foram transferidos 100µL da solução (1×10^5 células) a um tubo de cultura de 5 mL, e aplicados 5 µL de anexina V-FITC e 10 µL de PI. As células eram agitadas levemente, e incubadas por 15 minutos à temperatura

ambiente (20-25°C) no escuro. Ao final foram adicionados 400 µL de 1 x tampão de ligação a cada tubo, e os resultados eram analisados por citometria de fluxo (FACSCalibur, BD) (Raynal et al., 1994; Andree et al., 1990).

3.11. Análise Estatística

Para os dados do TNF-alfa liberado pelos hepatócitos foi aplicado o método de regressão linear da reação, sendo avaliadas duas propriedades: inclinação da reta e intersecção do eixo y. As comparações pertinentes foram realizadas através do teste de análise de variância, com pós-teste de contraste de Dunnet, considerando-se a reação controle como elemento diferenciador do contraste.

Foram avaliadas duas propriedades da regressão linear: a) inclinação da reta = índice usado como indicador cinético de taxa de liberação de TNF-alfa, considerando-se o estímulo da cepa ou de sua concentração; b) intersecção da reta com o eixo y = índice usado como indicador da capacidade de produção de TNF-alfa, considerando-se o estímulo da cepa ou a sua concentração. Essas duas propriedades foram analisadas separadamente por expressarem propriedades diferentes da cinética da reação. Na apresentação dos resultados padronizamos o termo “taxa produzida ao longo do tempo”, ou apenas “taxa” para expressar os números referentes à inclinação da reta, (o que representa quanto foi produzido do objeto em estudo ao longo do tempo) e “capacidade máxima” ou apenas “capacidade” para expressar os números referentes à intersecção da reta

com o eixo y, (o que representa quanto cada grupo é capaz de produzir no tempo zero). Todos os resultados foram expressos como média e desvio padrão.

As comparações foram realizadas através do teste de análise de variância com pós-teste de contraste de Dunnett, considerando-se como elemento diferenciador do contraste, a reação controle. As comparações foram realizadas intragrupo, entre as diversas concentrações, e intergrupo, entre as diversas cepas. As análises obedeceram ao seguinte critério: inicialmente realizou-se a regressão linear para se obter a inclinação e a intersecção da curva com o eixo y, então se obteve a melhor concentração a ser utilizada, ou seja, aquela que produzia a maior taxa de liberação ao longo do tempo, e a capacidade de produção de TNF-alfa para se comparar a melhor cepa. A concentração bacteriana que atendeu essas características foi 5×10^{10} .

Finalmente, o melhor tempo de incubação foi determinado (entre 1 e 6h de incubação) observando-se o valor da linearidade, comparando-se a liberação de TNF-alfa frente às diversas concentrações da mesma cepa. Calculou-se a média do valor da linearidade entre as diversas cepas, para que se pudesse determinar o maior valor obtido entre os tempos avaliados.

Para a análise dos resultados dos métodos TUNEL e Anexina, calculamos inicialmente a área sob a curva para cada experimento, a área foi calculada tendo no eixo x o tempo, e no eixo y a quantificação do TUNEL ou da Anexina. O valor da área foi expresso em UA (unidade de área).

Obteve-se assim, para cada ponto das seis concentrações estudadas, um valor de UA.

Secundariamente, a partir dos resultados da fase anterior, procedemos à regressão linear tendo no eixo x as seis concentrações, e no eixo y as respectivas UAs obtidas no procedimento anterior. Obteve-se boa linearidade tanto para TUNEL, quanto para Anexina, e foi calculada a inclinação da reta, e a intersecção do eixo y, expressos em valores de média e desvio padrão, para os quatro grupos estudados. Finalmente analisou-se através do teste de Análise de Variância (ANOVA) para medidas não repetidas, com pós-teste de Student-Newman e Keuls, a comparação das inclinações das retas, e das intersecções do eixo y, entre os grupos estudados.

Foi considerado para todo o estudo risco $\alpha \leq 0,05$ para erro de 1ª ordem ou de 1ª espécie, e risco $\beta \leq 0,20$ para erro de 2ª ordem ou de 2ª espécie.

4. Resultados

4.1. Cultura de hepatócitos

A viabilidade celular no dia 1 após extração dos hepatócitos do órgão-mãe atingiu 95% das células, com bom aspecto morfológico à microscopia óptica. A contagem celular mostrou número médio de $4,01 \times 10^8$ células/ml, que foi considerado satisfatório para o início da cultura primária. A viabilidade celular no dia 5 (ensaio experimental) foi de 91,2% com média de $1,8 \times 10^6$ hepatócitos/ml de meio.

O teste imunohistoquímico das células cultivadas mostrou resultados positivos para citoqueratina AE1 e AE3, compatível com o hepatócito. A determinação das isoenzimas de DHL no sobrenadante das garrafas revelou predominância da fração 5 da enzima DHL (72,2%), cuja principal origem conhecida é a célula hepática (Moura et al. 1982).

A pesquisa de albumina presente no sobrenadante das garrafas foi realizada no dia 8 de cultura, mostrando resultados positivos com níveis médios de 49,8 mg/L. É conveniente lembrar que a albumina não está presente no meio Williams E empregado na cultura. A sua produção pelos hepatócitos demonstrou que a célula cultivada em nosso modelo mantém diferenciação funcional, e está bem adaptada ao ambiente da cultura primária.

4.2. Curvas de crescimento das cepas de *L. monocytogenes* e *Salmonella* Typhimurium

Na figura 12 podemos observar o comportamento das cepas utilizadas nesse estudo, a saber, *Salmonella* Typhimurium, *Listeria monocytogenes* 4a, 4b e 1/2a, no decorrer de 24 horas de incubação. Analisando as curvas de crescimento, constatamos que *L. monocytogenes* 4b e 1/2a apresentaram comportamentos semelhantes, com fase lag (período de adaptação da bactéria, pré-crescimento) de 7h, indicando que as cepas necessitaram de um período considerável de adaptação às condições *in vitro*, para então iniciarem sua multiplicação. Quando isso aconteceu, entraram em fase de crescimento exponencial (fase log). As cepas atingiram absorvância máxima (patamar máximo de crescimento) após 13h de incubação.

A cepa *L. monocytogenes* 4a teve comportamento semelhante às cepas 4b e 1/2a, atingindo valores menores de absorvância, mas chegando aos mesmos tempos nas fases lag e log.

Pudemos notar também que a cepa de *Salmonella* Typhimurium apresentou fase lag menor, em torno de 4h, indicando que necessitou de um período menor de adaptação às condições *in vitro*, em relação às *Listerias*. A bactéria entrou em fase de crescimento exponencial a seguir, atingindo absorvância máxima após 8h de incubação.

Figura 12 - Curvas de crescimento das bactérias *Salmonella* Typhimurium (ST) e *Listeria monocytogenes* (LM) (sorogrupos 4a, 4b e 1/2a) obtidas por leitura da densidade óptica (540nm)

4.3. Atividade hemolítica e fosfolipídica de *L.monocytogenes*

Todas as cepas de *L. monocytogenes* testadas (4a, 4b e 1/2a) apresentaram fenótipo uniforme, não se verificando atividade hemolítica e fosfolipídica, na ausência do carvão ativado. Quando se adicionou carvão ativado ao meio BHI com lecitina, a fim de ativar o fator regulatório positivo PrfA, também não se detectou atividade hemolítica e fosfolipídica.

4.4. Recuperação de bactérias intracelulares

Calculamos a taxa da recuperação de *S. Typhimurium* e *L. monocytogenes* das culturas de hepatócitos, nos tempos de 1h a 6h de incubação, como descrito nas tabelas 2 a 5.

Tabela 2 - Variação na recuperação de *S. Typhimurium* em culturas de hepatócitos invadidos, semeadas em ágar sangue (contagem de bactérias em placa)

ST						
	Nº Bactérias					
	Tempo de Incubação		5x10 ⁵	%	5x10 ⁷	%
	1h		0	0	0	0
	2h		0	0	0	0
	3h		0	0	0	0
	4h		0	0	0	3,9x10 ⁶
	5h		0	0	2,1x10 ⁵	0,5
	6h		1,5x10 ³	0,3	3,9x10 ⁵	0,78

NOTA: Número de bactérias recuperadas do meio intracelular das monocamadas de células cultivadas, em garrafas de 25cm². Nas concentrações 5 x 10⁶, 5 x 10⁸ e 5 x 10⁹ não foram recuperadas bactérias.

Tabela 3 - Variação na recuperação de *L. monocytogenes* 4a em culturas de hepatócitos invadidos, semeadas em ágar sangue (contagem de bactérias em placa)

LM 4a						
Nº Bactérias	5x10 ⁵	%	5x10 ⁷	%	5x10 ¹⁰	%
Tempo de Incubação						
1h	0	0	0	0	0	0
2h	0	0	0	0	10	2x10 ⁻⁸
3h	0	0	0	0	70	1,4x10 ⁻⁷
4h	0	0	10	2x10 ⁻⁵	100	2x10 ⁻⁸
5h	0	0	40	8x10 ⁻⁵	130	2,6x10 ⁻⁷
6h	10	2x10 ⁻³	100	2x10 ⁻⁶	200	4x10 ⁻⁷

NOTA: Número de bactérias recuperadas do meio intracelular das monocamadas de células cultivadas, em garrafas de 25cm². Nas concentrações 5 x 10⁶, 5 x 10⁸ e 5 x 10⁹ não foram recuperadas bactérias.

Tabela 4 - Variação na recuperação de *L. monocytogenes* 4b em culturas de hepatócitos invadidos, semeadas em ágar sangue (contagem de bactérias em placa)

LM 4b						
Nº Bactérias	5x10 ⁵	%	5x10 ⁷	%	5x10 ¹⁰	%
Tempo de Incubação						
1h	0	0	0	0	0	0
2h	0	0	0	0	110	2,2x10 ⁻⁷
3h	0	0	10	2x10 ⁻⁵	210	4,2x10 ⁻⁷
4h	0	0	60	1,2x10 ⁻⁴	400	8x10 ⁻⁷
5h	100	2x10 ⁻²	180	3,6x10 ⁻⁴	940	1,8x10 ⁻⁶
6h	200	4x10 ⁻²	340	6,8x10 ⁻⁴	1500	3x10 ⁻⁶

NOTA: Número de bactérias recuperadas do meio intracelular das monocamadas de células cultivadas, em garrafas de 25cm². Nas concentrações 5 x 10⁶, 5 x 10⁸ e 5 x 10⁹ não foram recuperadas bactérias.

Tabela 5 - Variação na recuperação de *L. monocytogenes* 1/2a de culturas de hepatócitos invadidos, semeadas em ágar sangue (contagem de bactérias em placa)

LM 1/2a						
Nº Bactérias	5x10 ⁵	%	5x10 ⁷	%	5x10 ¹⁰	%
Tempo de Incubação						
1h	0	0	0	0	0	0
2h	0	0	0	0	10	2x10 ⁻⁸
3h	0	0	10	2x10 ⁻⁵	100	2x10 ⁻⁷
4h	0	0	160	3,2x10 ⁻⁴	160	3,2x10 ⁻⁷
5h	0	0	200	4x10 ⁻⁴	290	5,8x10 ⁻⁷
6h	200	4x10 ⁻²	300	6x10 ⁻⁴	400	8x10 ⁻⁷

NOTA: Número de bactérias recuperadas do meio intracelular das monocamadas de células cultivadas, em garrafas de 25cm². Nas concentrações 5 x 10⁶, 5 x 10⁸ e 5 x 10⁹ não foram recuperadas bactérias.

Analisando as tabelas 2, 3, 4 e 5, podemos verificar que houve maior recuperação de *S. Typhimurium* em comparação às demais bactérias. Recuperamos cerca de 10⁵ vezes mais *S. Typhimurium* do que *L. monocytogenes* 4a, 10⁴ vezes mais do que *L. monocytogenes* 4b, e 5x10⁵ vezes mais do que *L. monocytogenes* 1/2a.

Recuperamos cerca de 340 vezes mais *L. monocytogenes* 4b em comparação a 4a. A diferença na recuperação entre *L. monocytogenes* 4b e 1/2a foi discreta. Comparando a taxa de recuperação de LM 4a e LM 1/2a, verificamos que LM 1/2a foi recuperada 300 vezes mais.

4.5. Avaliação da liberação de TNF-alfa por hepatócitos invadidos por *S. Typhimurium* e *L. monocytogenes*

Os dados da liberação de TNF-alfa em pg/mL (médias) estão disponibilizados na tabela 6 (Apêndice I).

4.5.1. Comparação entre a liberação de TNF-alfa por hepatócitos controle e hepatócitos estimulados com estaurosporina

Foi realizada a comparação estatística da liberação de TNF-alfa por hepatócitos controle, e por hepatócitos estimulados com estaurosporina. Os resultados podem ser vistos na tabela 7 e na figura 13.

Tabela 7 - Comparação da taxa de liberação de TNF-alfa e capacidade de produção entre os grupos controle e estaurosporina

TNF-alfa	Controles	STA
Taxa de liberação (Inclinação da reta)	1.257 ± 1.210	9.245 ± 2.680
Capacidade de produção (Intersecção do eixo Y)	8.362 ± 4.711	46.81 ± 10.44
r²	0,2126	0,7485
Valor P	0,3574	0,026

Nota: STA: estaurosporina (200ng/mL)

Figura 13 - Liberação de TNF-alfa (pg/ml) por hepatócitos controle e hepatócitos estimulados com estaurosporina, ao longo do tempo.

NOTA: Controles versus tempo $P = 0,3574$; estaurosporina (STA) versus tempo $P = 0,026$.

Através da tabela e do gráfico pode-se verificar que, tanto a inclinação da reta, quanto a sua intersecção com o eixo Y, são diferentes para o grupo controle e para o grupo estimulado com estaurosporina 200ng/mL, havendo diferença estatística significativa entre os valores de TNF-alfa obtidos ao longo dos tempos de incubação, apenas para o grupo estaurosporina.

4.5.2. Comparação entre a liberação de TNF-alfa por hepatócitos invadidos por *S. Typhimurium* em diferentes concentrações

Foi realizada a comparação estatística da liberação de TNF-alfa por hepatócitos invadidos por *S. Typhimurium*, em diferentes concentrações da bactéria. Os resultados podem ser vistos na tabela 8 e na figura 14.

Tabela 8 - Comparação da taxa de liberação de TNF-alfa e capacidade de produção entre diferentes concentrações de S. Typhimurium

ST	5×10^5	5×10^6	5×10^7	5×10^8	5×10^9	5×10^{10}
Taxa de liberação de TNF-alfa (Inclinação da reta)	33.58 ± 2.218	40.39 ± 4.108	67.66 ± 9.859	114.8 ± 21.11	121.7 ± 6.737	146.9 ± 18.38
Capacidade de produção de TNF-alfa (Intersecção eixo Y)	-2.611 ± 8.638	-1.768 ± 16.00	-49.44 ± 38.39	-129.8 ± 82.22	-80.72 ± 26.24	-67.20 ± 71.56
r²	0,9828	0,9603	0,9217	0,8809	0,9879	0,9411
Valor P	0,0001	0,0006	0,0024	0,0055	< 0,0001	0,0013

Nota: ST: *Salmonella Typhimurium*

Figura 14 - Liberação de TNF-alfa por hepatócitos invadidos por *S. Typhimurium* ao longo do tempo, nas concentrações 5×10^5 a 5×10^{10}
NOTA: $P < 0,001$

Nessa análise, a inclinação da reta foi maior na concentração de ST 5×10^{10} , indicando que houve maior taxa de secreção de TNF-alfa pelos hepatócitos nessa concentração. A intersecção do eixo Y indicou que na concentração de ST 5×10^8 foi registrada a maior capacidade de produção de TNF-alfa pelos hepatócitos invadidos. Os resultados mostraram que houve diferenças significativas de taxa de liberação e capacidade de produção de TNF em relação ao tempo ($P < 0,001$).

4.5.3. Comparação entre a liberação de TNF-alfa liberado por hepatócitos invadidos por *L. monocytogenes* 4a em diferentes concentrações

Foi realizada a comparação estatística da liberação de TNF-alfa por hepatócitos invadidos por *L. monocytogenes* 4a em diferentes concentrações da bactéria. Os resultados podem ser vistos na tabela 9 e na figura 15.

Tabela 9 - Comparação da taxa de liberação de TNF-alfa e capacidade de produção entre diferentes concentrações de *L. monocytogenes* 4a

LM 4a	5 x 10 ⁵	5 x 10 ⁶	5 x 10 ⁷	5 x 10 ⁸	5 x 10 ⁹	5 x 10 ¹⁰
Taxa de liberação de TNF-alfa (Inclinação da reta)	28.52 ± 2.291	30.23 ± 2.840	37.90 ± 3.559	45.63 ± 3.040	85.37 ± 12.40	94.71 ± 13.89
Capacidade de produção de TNF-alfa (Intersecção eixo Y)	-23.90 ± 8.924	-1.801 ± 11.06	-9.258 ± 13.86	-14.73 ± 11.84	-78.39 ± 48.27	-46.49 ± 54.10
r ²	0,9748	0,9659	0,9659	0,9826	0,9222	0,9208
p	0,0002	0,0004	0,0004	0,0001	0,0023	0,0024

NOTA: os valores de TNF-alfa são expressos em pg/mL; LM 4a: *Listeria monocytogenes* 4a

Figura 15 – Liberação de TNF-alfa por hepatócitos invadidos por *L. monocytogenes* 4a ao longo do tempo, nas concentrações 5×10^5 a 5×10^{10}
NOTA: $P < 0,001$

A figura 15 mostra que a inclinação da reta foi maior na concentração de LM 4a 5×10^{10} , indicando que houve maior taxa de secreção de TNF-alfa pelos hepatócitos nessa concentração. A intersecção do eixo Y indicou que na concentração 5×10^9 foi verificada a maior capacidade de produção de TNF-alfa pelas células invadidas. Houve diferenças significativas de taxa de liberação e capacidade de produção de TNF-alfa em relação ao tempo ($P < 0,001$).

4.5.4. Comparação entre a liberação de TNF-alfa por hepatócitos invadidos por *L. monocytogenes* 4b entre diferentes concentrações

Foi realizada a comparação estatística da liberação de TNF-alfa por hepatócitos invadidos por *L. monocytogenes* 4b em diferentes concentrações da bactéria. Os resultados podem ser vistos na tabela 10 e na figura 16.

Tabela 10 - Comparação da taxa de liberação de TNF-alfa e capacidade de produção entre diferentes concentrações de *L. monocytogenes* 4b

LM 4b	5×10^5	5×10^6	5×10^7	5×10^8	5×10^9	5×10^{10}
Taxa de Liberação de TNF-alfa (Inclinação da reta)	27.92 ± 4.033	26.24 ± 2.949	24.24 ± 1.952	24.53 ± 1.523	31.63 ± 1.960	94.52 ± 15.66
Capacidade de produção de TNF-alfa (Intersecção eixo Y)	-28.32 ± 15.71	-9.176 ± 11.49	7.495 ± 7.602	15.20 ± 5.929	7.826 ± 7.634	-106.3 ± 61.00
r²	0,923	0,9519	0,9747	0,9848	0,9849	0,901
Valor p	0,0023	0,0009	0,0002	< 0,0001	< 0,0001	0,0038

NOTA: os valores de TNF-alfa são expressos em pg/mL; LM 4b: *Listeria monocytogenes* 4b

Figura 16 - Liberação de TNF-alfa por hepatócitos invadidos por *L. monocytogenes* 4b ao longo do tempo, nas concentrações 5×10^5 a 5×10^{10}
NOTA: $P < 0,001$

Os resultados mostraram que a inclinação da reta foi maior na concentração de LM 4b 5×10^{10} , indicando que houve maior taxa de secreção de TNF-alfa nessa concentração. A intersecção do eixo Y indicou que, também na concentração 5×10^{10} , houve maior capacidade de produção de TNF-alfa pelos hepatócitos invadidos. Também aqui houve diferenças significativas da taxa de liberação e capacidade de produção de TNF-alfa em relação ao tempo ($P < 0,001$).

4.5.5. Comparação da liberação de TNF-alfa por hepatócitos invadidos por *L. monocytogenes* 1/2a entre diferentes concentrações

Foi realizada a comparação estatística da taxa de liberação de TNF-alfa (inclinação da reta) por hepatócitos invadidos por *L. monocytogenes* 1/2a em diferentes concentrações da bactéria. Os resultados podem ser vistos na tabela 11 e na figura 17.

Tabela 11 - Comparação da taxa de liberação de TNF-alfa e capacidade de produção entre diferentes concentrações de *L. monocytogenes* 1/2a

LM 1/2a	5×10^5	5×10^6	5×10^7	5×10^8	5×10^9	5×10^{10}
Taxa de liberação de TNF-alfa (Inclinação da reta)	12.31 ± 3.242	26.05 ± 4.764	30.96 ± 5.277	38.52 ± 5.752	49.41 ± 9.538	58.16 ± 15.49
Capacidade de produção de TNF-alfa (Intersecção eixo Y)	19.16 ± 12.63	3.441 ± 18.55	-0.3884 ± 20.55	1.866 ± 22.40	-4.510 ± 37.14	13.13 ± 60.31
r^2	0,7827	0,882	0,8959	0,9181	0,8703	0,779
Valor p	0,0192	0,0054	0,0042	0,0026	0,0066	0,0199

NOTA: os valores de TNF-alfa são expressos em pg/mL; LM 1/2a: *Listeria monocytogenes* 1/2a

Figura 17 - Liberação de TNF-alfa por hepatócitos invadidos por *L. monocytogenes* 1/2a ao longo do tempo, nas concentrações 5×10^5 a 5×10^{10}
NOTA: $P < 0,01$

Na figura 17 podemos observar que a inclinação da reta foi maior na concentração de LM 1/2a 5×10^{10} , indicando que houve maior taxa de secreção de TNF-alfa nessa concentração. A intersecção do eixo Y indicou que na concentração 5×10^5 houve maior capacidade de produção de TNF-alfa. Houve, novamente, diferenças significativas na taxa de liberação e na capacidade de produção de TNF-alfa em relação ao tempo ($P < 0,01$).

4.5.6. Teste de comparação múltipla de Dunnet entre as taxas de liberação de TNF-alfa dos grupos controle, estaurosporina e *S. Typhimurium* em diferentes concentrações

Realizamos a comparação estatística da taxa de liberação de TNF-alfa (inclinação da reta) entre hepatócitos invadidos por *S. Typhimurium*, hepatócitos estimulados com estaurosporina, e hepatócitos controle. Os resultados das comparações estatísticas das inclinações das retas podem ser vistos na tabela 12. Os dados transformados em formato “box plot” podem ser observados na figura 18.

Tabela 12 - Comparação entre as taxas de liberação de TNF-alfa nos grupos controle, estaurosporina e *S. Typhimurium*, em diferentes concentrações

Parâmetro	Valor P
Comparação entre os grupos por ANOVA one-way	P<0,0001
Controle vs STA ¹	P < 0,05
Controle vs ST 5 x 10 ⁵	P > 0,05 (NS) ²
Controle vs ST 5 x 10 ⁶	P > 0,05 (NS)
Controle vs ST 5 x 10 ⁷	P < 0,01
Controle vs ST 5 x 10 ⁸	P < 0,01
Controle vs ST 5 x 10 ⁹	P < 0,01
Controle vs ST 5 x 10 ¹⁰	P < 0,01
STA ³ vs ST 5 x 10 ⁵	P < 0,001

continua

Parâmetro	Valor P
STA vs ST 5 x 10 ⁶	P < 0,001
STA vs ST 5 x 10 ⁷	P < 0,001
STA vs ST 5 x 10 ⁸	P < 0,001
STA vs ST 5 x 10 ⁹	P < 0,001
STA vs ST 5 x 10 ¹⁰	P < 0,001
ST 5 x 10 ⁵ vs ST 5 x 10 ⁶	P > 0,05 (NS)
ST 5 x 10 ⁵ vs ST 5 x 10 ⁷	P < 0,001
ST 5 x 10 ⁵ vs ST 5 x 10 ⁸	P < 0,001
ST 5 x 10 ⁵ vs ST 5 x 10 ⁹	P < 0,001
ST 5 x 10 ⁵ vs ST 5 x 10 ¹⁰	P < 0,001
ST 5 x 10 ⁶ vs ST 5 x 10 ⁷	P < 0,001
ST 5 x 10 ⁶ vs ST 5 x 10 ⁸	P < 0,001
ST 5 x 10 ⁶ vs ST 5 x 10 ⁹	P < 0,001
ST 5 x 10 ⁶ vs ST 5 x 10 ¹⁰	P < 0,001
ST 5 x 10 ⁷ vs ST 5 x 10 ⁸	P < 0,001
ST 5 x 10 ⁷ vs ST 5 x 10 ⁹	P < 0,001
ST 5 x 10 ⁷ vs ST 5 x 10 ¹⁰	P < 0,001
ST 5 x 10 ⁸ vs ST 5 x 10 ⁹	P > 0,05 (NS)
ST 5 x 10 ⁸ vs ST 5 x 10 ¹⁰	P < 0,001
ST 5 x 10 ⁹ vs ST 5 x 10 ¹⁰	P < 0,001

NOTA: ¹ Todas as comparações com grupos controle foram feitas pelo teste de comparação múltipla de Dunnett; ² NS = não significativo; ³ Todas as comparações entre grupos de bactérias versus estaurosporina (STA), e entre concentrações de ST entre si, foram feitas pelo teste de comparação múltipla de Newman-Keuls.

Figura 18 - Aplicação do Teste de Dunnett, comparando a taxa de liberação de TNF-alfa entre hepatócitos controle e hepatócitos invadidos por *S. Typhimurium* nas concentrações 5×10^5 - 5×10^{10} .

NOTA: STA: estaurosporina (200ng/mL); ST: *Salmonella Typhimurium*.

Os resultados mostraram maior significância em relação ao controle, para a taxa de liberação de TNF-alfa dos hepatócitos invadidos, nas concentrações de *S. Typhimurium* acima de 5×10^7 . Na concentração 5×10^8 foi registrada a maior taxa de liberação de TNF-alfa pelos hepatócitos nessas condições. Todas as concentrações de ST mostraram diferença estatística em relação ao grupo estaurosporina. Na comparação entre concentrações, a concentração de ST 5×10^5 produziu menor taxa de liberação de TNF-alfa em relação às demais concentrações, com exceção de 5×10^6 . A concentração de ST 5×10^6 também produziu taxa de liberação de TNF-alfa menor do que as concentrações acima, o mesmo ocorrendo com ST 5×10^7 e as concentrações acima. Não houve diferença na taxa de liberação de TNF-alfa entre as concentrações de 5×10^8 e 5×10^9 , enquanto a concentração de 5×10^{10} foi diferente de todas as concentrações menores.

4.5.7. Teste de comparação múltipla de Dunnet entre as taxas de liberação de TNF-alfa dos grupos controle, estaurosporina e *L. monocytogenes* 4a em diferentes concentrações

Foi realizada a comparação estatística da taxa de liberação de TNF-alfa (inclinação da reta) entre hepatócitos invadidos por *L. monocytogenes* 4a, hepatócitos estimulados com estaurosporina, e hepatócitos controle. Os resultados das comparações estatísticas das inclinações das retas podem

ser visto na tabela 13. Os dados transformados em formato “box plot” podem ser observados na figura 19.

Tabela 13 - Comparação entre as taxas de liberação de TNF-alfa nos grupos controle, estaurosporina e *L. monocytogenes* 4a, em diferentes concentrações

Parâmetro	Valor P
Comparação entre os grupos por ANOVA one-way	P<0,0001
Controle vs STA ¹	P < 0,01
Controle vs LM 4a 5 x 10 ⁵	P < 0,01
Controle vs LM 4a 5 x 10 ⁶	P < 0,01
Controle vs LM 4a 5 x 10 ⁷	P < 0,01
Controle vs LM 4a 5 x 10 ⁸	P < 0,01
Controle vs LM 4a 5 x 10 ⁹	P < 0,01
Controle vs LM 4a 5 x 10 ¹⁰	P < 0,01
STA ² vs LM 4a 5 x 10 ⁵	P < 0,001
STA vs LM 4a 5 x 10 ⁶	P < 0,001
STA vs LM 4a 5 x 10 ⁷	P < 0,001
STA vs LM 4a 5 x 10 ⁸	P < 0,001
STA vs LM 4a 5 x 10 ⁹	P < 0,001
STA vs LM 4a 5 x 10 ¹⁰	P < 0,001
LM 4a 5 x 10 ⁵ vs LM 4a 5 x 10 ⁶	P > 0,05 (NS) ³

continua

Parâmetro	Valor P
LM 4a 5 x 10 ⁵ vs LM 4a 5 x 10 ⁷	P < 0,001
LM 4a 5 x 10 ⁵ vs LM 4a 5 x 10 ⁸	P < 0,001
LM 4a 5 x 10 ⁵ vs LM 4a 5 x 10 ⁹	P < 0,001
LM 4a 5 x 10 ⁵ vs LM 4a 5 x 10 ¹⁰	P < 0,001
LM 4a 5 x 10 ⁶ vs LM 4a 5 x 10 ⁷	P < 0,01
LM 4a 5 x 10 ⁶ vs LM 4a 5 x 10 ⁸	P < 0,001
LM 4a 5 x 10 ⁶ vs LM 4a 5 x 10 ⁹	P < 0,001
LM 4a 5 x 10 ⁶ vs LM 4a 5 x 10 ¹⁰	P < 0,001
LM 4a 5 x 10 ⁷ vs LM 4a 5 x 10 ⁸	P < 0,01
LM 4a 5 x 10 ⁷ vs LM 4a 5 x 10 ⁹	P < 0,001
LM 4a 5 x 10 ⁷ vs LM 4a 5 x 10 ¹⁰	P < 0,001
LM 4a 5 x 10 ⁸ vs LM 4a 5 x 10 ⁹	P < 0,001
LM 4a 5 x 10 ⁸ vs LM 4a 5 x 10 ¹⁰	P < 0,001
LM 4a 5 x 10 ⁹ vs LM 4a 5 x 10 ¹⁰	P < 0,001

NOTA: ¹ Todas as comparações com grupos controle foram feitas pelo teste de comparação múltipla de Dunnett; ² Todas as comparações entre grupos de bactérias versus estaurosporina (STA), e entre concentrações de LM 4a entre si, foram feitas pelo teste de comparação múltipla de Newman-Keuls;³ NS = não significativo.

Figura 19 - Aplicação do Teste de Dunnett, comparando as taxas de liberação de TNF-alfa entre hepatócitos controle e invadidos por *L. monocytogenes* 4a nas concentrações 5×10^5 - 5×10^{10}

NOTA: STA: estaurosporina (200ng/mL); LM: *Listeria monocytogenes*

A análise dos resultados indicou significância estatística em relação ao grupo controle, em todas as concentrações de LM 4a analisadas. Na concentração de 5×10^9 houve a maior taxa de liberação de TNF-alfa. Todas as concentrações de LM 4a mostraram diferença estatística em relação ao grupo estaurosporina. Na comparação entre concentrações, a concentração de LM 4a 5×10^5 produziu menor taxa de liberação de TNF-alfa em relação às demais concentrações, com exceção de 5×10^6 . A concentração de LM 4a 5×10^6 também produziu taxa de liberação de TNF-alfa menor do que as concentrações acima, o mesmo ocorrendo com LM 4a 5×10^7 e as concentrações acima. Houve diferença na taxa de liberação de TNF-alfa entre as concentrações de LM 4a 5×10^8 e 5×10^9 , enquanto a concentração de 5×10^{10} foi diferente de todas as concentrações menores.

4.5.8. Teste de comparação múltipla de Dunnet entre as taxas de liberação de TNF-alfa dos grupos controle, estaurosporina e *L. monocytogenes* 4b em diferentes concentrações

Foi realizada a comparação estatística da taxa de liberação de TNF-alfa (inclinação da reta) entre hepatócitos invadidos por *L. monocytogenes* 4b, hepatócitos estimulados com estaurosporina, e hepatócitos controle. Os resultados das comparações estatísticas das inclinações das retas pode ser

visto na tabela 14, Os dados transformados em formato “box plot” podem ser observados na figura 20.

Tabela 14 - Comparação entre as taxas de liberação de TNF-alfa dos grupos controle, estaurosporina e *L. monocytogenes* 4b, em diferentes concentrações

Parâmetro	Valor P
Comparação entre os grupos por ANOVA one-way	P<0,0001
Controle vs STA ¹	P < 0,01
Controle vs LM 4b 5 x 10 ⁵	P < 0,01
Controle vs LM 4b 5 x 10 ⁶	P > 0,05 (NS) ²
Controle vs LM 4b 5 x 10 ⁷	P > 0,05 (NS)
Controle vs LM 4b 5 x 10 ⁸	P > 0,05 (NS)
Controle vs LM 4b 5 x 10 ⁹	P > 0,05 (NS)
Controle vs LM 4b 5 x 10 ¹⁰	P < 0,01
STA ³ vs LM 4b 5 x 10 ⁵	P < 0,001
STA vs LM 4b 5 x 10 ⁶	P < 0,001
STA vs LM 4b 5 x 10 ⁷	P < 0,001
STA vs LM 4b 5 x 10 ⁸	P < 0,001
STA vs LM 4b 5 x 10 ⁹	P < 0,001
STA vs LM 4b 5 x 10 ¹⁰	P < 0,001
LM 4b 5 x 10 ⁵ vs LM 4b 5 x 10 ⁶	P > 0,05 (NS)
LM 4b 5 x 10 ⁵ vs LM 4b 5 x 10 ⁷	P > 0,05 (NS)
LM 4b 5 x 10 ⁵ vs LM 4b 5 x 10 ⁸	P > 0,05 (NS)

continua

Parâmetro	Valor P
LM 4b 5 x 10 ⁵ vs LM 4b 5 x 10 ⁹	P > 0,05 (NS)
LM 4b 5 x 10 ⁵ vs LM 4b 5 x 10 ¹⁰	P < 0,001
LM 4b 5 x 10 ⁶ vs LM 4b 5 x 10 ⁷	P > 0,05 (NS)
LM 4b 5 x 10 ⁶ vs LM 4b 5 x 10 ⁸	P > 0,05 (NS)
LM 4b 5 x 10 ⁶ vs LM 4b 5 x 10 ⁹	P < 0,05
LM 4b 5 x 10 ⁶ vs LM 4b 5 x 10 ¹⁰	P < 0,001
LM 4b 5 x 10 ⁶ vs LM 4b 5 x 10 ¹⁰	P < 0,001
LM 4b 5 x 10 ⁷ vs LM 4b 5 x 10 ⁸	P > 0,05 (NS)
LM 4b 5 x 10 ⁷ vs LM 4b 5 x 10 ⁹	P < 0,01
LM 4b 5 x 10 ⁷ vs LM 4b 5 x 10 ¹⁰	P < 0,001
LM 4b 5 x 10 ⁸ vs LM 4b 5 x 10 ⁹	P < 0,01
LM 4b 5 x 10 ⁸ vs LM 4b 5 x 10 ¹⁰	P < 0,001
LM 4b 5 x 10 ⁹ vs LM 4b 5 x 10 ¹⁰	P < 0,001

NOTA: ¹ Todas as comparações com grupos controle foram feitas pelo teste de comparação múltipla de Dunnett; ² NS = não significativo; ³ Todas as comparações entre grupos de bactérias versus estaurosporina (STA), e entre concentrações de LM 4b entre si, foram feitas pelo teste de comparação múltipla de Newman-Keuls.

Figura 20 - Aplicação do Teste de Dunnett, comparando as taxas de liberação de TNF-alfa entre hepatócitos controle e invadidos por *L. monocytogenes* 4b nas concentrações 5×10^5 - 5×10^{10} .

NOTA: STA: estaurosporina (200ng/mL); LM: *Listeria monocytogenes*

Os resultados mostraram diferença significativa apenas entre as concentrações de LM 4b 5×10^5 e 5×10^{10} em relação ao controle. Na concentração 5×10^{10} da bactéria houve maior taxa de liberação de TNF-alfa.

Todas as concentrações de LM 4b mostraram diferença estatística em relação ao grupo estaurosporina. Na comparação entre concentrações, a concentração de LM 4b 5×10^5 produziu menor taxa de liberação de TNF-alfa apenas em relação a LM 4b 5×10^{10} . A concentração de LM 4b 5×10^6 produziu taxa de liberação de TNF-alfa menor em relação às concentrações 5×10^9 e 5×10^{10} , o mesmo ocorrendo com LM 4b 5×10^7 . Houve diferença na taxa de liberação de TNF-alfa entre as concentrações de LM 4b 5×10^8 e 5×10^9 , enquanto a concentração de 5×10^{10} foi diferente de todas as concentrações menores.

4.5.9. Teste de comparação múltipla de Dunnet entre as taxas de liberação de TNF-alfa dos grupos controle, estaurosporina e *L. monocytogenes* 1/2a em diferentes concentrações

Realizamos a comparação estatística da taxa de liberação de TNF-alfa (inclinação da reta) entre hepatócitos invadidos por *L. monocytogenes* 1/2a, hepatócitos estimulados com estaurosporina, e hepatócitos controle. Os resultados das comparações estatísticas das inclinações das retas podem

ser visto na tabela 15. Os dados transformados em formato “box plot” podem ser observados na figura 21.

Tabela 15 - Comparação entre as taxas de liberação de TNF-alfa dos grupos controle, estaurosporina e *L. monocytogenes* 1/2a, em diferentes concentrações

Parâmetro	Valor P
Comparação entre grupos por ANOVA one-way	P < 0,01
Controle vs STA ¹	P < 0,01
Controle vs LM 1/2a 5 x 10 ⁵	P > 0,05 (NS) ²
Controle vs LM 1/2a 5 x 10 ⁶	P > 0,05 (NS)
Controle vs LM 1/2a 5 x 10 ⁷	P > 0,05 (NS)
Controle vs LM 1/2a 5 x 10 ⁸	P > 0,05 (NS)
Controle vs LM 1/2a 5 x 10 ⁹	P > 0,05 (NS)
Controle vs LM 1/2a 5 x 10 ¹⁰	P > 0,05 (NS)
STA ³ vs LM 1/2a 5 x 10 ⁵	P > 0,05 (NS)
STA vs LM 1/2a 5 x 10 ⁶	P < 0,001
STA vs LM 1/2a 5 x 10 ⁷	P < 0,001
STA vs LM 1/2a 5 x 10 ⁸	P < 0,001
STA vs LM 1/2a 5 x 10 ⁹	P < 0,001
STA vs LM 1/2a 5 x 10 ¹⁰	P < 0,001
LM 1/2a 5 x 10 ⁵ vs LM 1/2a 5 x 10 ⁶	P < 0,001
LM 1/2a 5 x 10 ⁵ vs LM 1/2a 5 x 10 ⁷	P < 0,001
LM 1/2a 5 x 10 ⁵ vs LM 1/2a 5 x 10 ⁸	P < 0,001
LM 1/2a 5 x 10 ⁵ vs LM 1/2a 5 x 10 ⁹	P < 0,001

continua

Parâmetro	Valor P
LM 1/2a 5 x 10 ⁵ vs LM 1/2a 5 x 10 ¹⁰	P < 0,001
LM 1/2a 5 x 10 ⁶ vs LM 1/2a 5 x 10 ⁷	P < 0,05
LM 1/2a 5 x 10 ⁶ vs LM 1/2a 5 x 10 ⁸	P < 0,001
LM 1/2a 5 x 10 ⁶ vs LM 1/2a 5 x 10 ⁹	P < 0,001
LM 1/2a 5 x 10 ⁶ vs LM 1/2a 5 x 10 ¹⁰	P < 0,001
LM 1/2a 5 x 10 ⁷ vs LM 1/2a 5 x 10 ⁸	P < 0,01
LM 1/2a 5 x 10 ⁷ vs LM 1/2a 5 x 10 ⁹	P < 0,001
LM 1/2a 5 x 10 ⁷ vs LM 1/2a 5 x 10 ¹⁰	P < 0,001
LM 1/2a 5 x 10 ⁸ vs LM 1/2a 5 x 10 ⁹	P < 0,001
LM 1/2a 5 x 10 ⁸ vs LM 1/2a 5 x 10 ¹⁰	P < 0,001
LM 1/2a 5 x 10 ⁹ vs LM 1/2a 5 x 10 ¹⁰	P < 0,001

NOTA: ¹ Todas as comparações com grupos controle foram feitas pelo teste de comparação múltipla de Dunnett; ² NS = não significativo; ³ Todas as comparações entre grupos de bactérias versus estaurosporina (STA), e entre concentrações de LM 1/2a entre si, foram feitas pelo teste de comparação múltipla de Newman-Keuls.

Figura 21 - Aplicação do Teste de Dunnett, comparando as taxas de liberação de TNF-alfa em hepatócitos controle e invadidos por *L. monocytogenes* 1/2a nas concentrações 5×10^5 - 5×10^{10}

NOTA: STA: estaurosporina (200ng/mL); ST: *Salmonella* Typhimurium; LM: *Listeria monocytogenes*

A análise estatística indicou que não havia diferença significativa em relação ao controle em nenhuma concentração de *L.monocytogenes* 1/2a pesquisada. Havia diferença significativa apenas entre controle e estaurosporina. Houve diferença entre o grupo estaurosporina e as várias concentrações de LM 1/2a, com exceção de LM 1/2a 5×10^5 . Houve diferença também entre LM 1/2a 5×10^5 e todas as concentrações acima, o mesmo acontecendo com os grupos LM 1/2a 5×10^6 , 5×10^7 e 5×10^8 . Novamente a concentração de 5×10^{10} foi diferente de todas as concentrações menores, produzindo os maiores valores de liberação de TNF-alfa na comparação entre as várias concentrações de LM 1/2a.

4.5.10. Teste de comparação múltipla de Dunnet entre as taxas de liberação de TNF-alfa dos grupos *S. Typhimurium*, *L. monocytogenes* 4a, 4b e 1/2a na concentração 5×10^{10}

Para essa comparação, foi definida a melhor concentração a ser utilizada, ou seja, aquela que produzia a maior taxa e capacidade de produção de TNF-alfa, para se comparar as cepas. A concentração das bactérias que apresentou essas características foi 5×10^{10} .

Foi realizada a comparação dos resultados da taxa de liberação de TNF-alfa (inclinação da reta) entre hepatócitos invadidos por *S. Typhimurium* e *L. monocytogenes* (cepas 4a, 4b e 1/2a), hepatócitos controle e hepatócitos estimulados com estaurosporina, fixando a concentração das bactérias em 5×10^{10} . Os resultados das comparações estatísticas das

inclinações das retas podem ser vistos na tabela 16. Os dados transformados em formato “box plot” podem ser observados na figura 22.

Tabela 16 - Comparação entre as taxas de liberação de TNF-alfa dos grupos controle, estaurosporina, *S. Typhimurium* e *L. monocytogenes* (4a, 4b e 1/2a), em diferentes concentrações

Parâmetro	Valor P
Comparação entre grupos por ANOVA one-way	P<0,0001
ST 5 x 10 ¹⁰ vs Controle ¹	P < 0,05
ST 5 x 10 ¹⁰ vs STA	P < 0,05
ST 5 x 10 ¹⁰ vs LM 4a 5 x 10 ¹⁰	P < 0,05
ST 5 x 10 ¹⁰ vs LM 4b 5 x 10 ¹⁰	P < 0,05
ST 5 x 10 ¹⁰ vs LM 1/2a 5 x 10 ¹⁰	P < 0,05
Controle ² vs LM 4a 5 x 10 ¹⁰	P < 0,001
Controle ² vs LM 4b 5 x 10 ¹⁰	P < 0,001
Controle ² vs LM 1/2a 5 x 10 ¹⁰	P < 0,001
Controle ² vs STA	P > 0,05 (NS) ³
STA ² vs LM 4a 5 x 10 ¹⁰	P < 0,001
STA ² vs LM 4b 5 x 10 ¹⁰	P < 0,001
STA ² vs LM 1/2a 5 x 10 ¹⁰	P < 0,001
LM ² 1/2a 5 x 10 ¹⁰ vs LM 4a 5 x 10 ¹⁰	P < 0,001
LM ² 1/2a 5 x 10 ¹⁰ vs LM 4b 5 x 10 ¹⁰	P < 0,001
LM ² 4b 5 x 10 ¹⁰ vs LM 4a 5 x 10 ¹⁰	P > 0,05 (NS)

NOTA: ¹ Todas as comparações entre o grupo ST 5 x 10¹⁰ e os demais grupos foram feitas pelo teste de comparação múltipla de Dunnett; ² Todas as comparações entre os demais grupos de bactérias versus estaurosporina (STA), e os grupos entre si, foram feitas pelo teste de comparação múltipla de Newman-Keuls; ³ NS = não significativo.

Figura 22 - Aplicação do Teste de Dunnett, comparando as taxas de liberação de TNF-alfa entre hepatócitos invadidos por *S. Typhimurium* e *L. monocytogenes* 4a, 4b e 1/2a na concentração 5×10^{10}
NOTA: STA: estaurosporina (200ng/mL); ST: *Salmonella Typhimurium*; LM: *Listeria monocytogenes*

A análise estatística das comparações entre os vários grupos versus o grupo ST (maior taxa de liberação de TNF-alfa), indicou que havia diferença significativa quanto às taxas de liberação de TNF-alfa entre ST e as outras bactérias (fixada a concentração de 5×10^{10}), bem como entre ST e STA, e entre ST e controle. Na comparação entre grupos, podemos observar que todas as bactérias foram diferentes em relação ao controle quando foi fixada a concentração de 5×10^{10} , bem como em relação ao grupo estaurosporina. Outro fato que pode ser observado é que LM 1/2a produziu a menor taxa de liberação de TNF-alfa em relação às outras cepas de *L.monocytogenes* estudadas.

4.5.11. Teste de comparação múltipla de Dunnett entre as capacidades de produção de TNF-alfa do grupo *S. Typhimurium* em diferentes concentrações

Foi realizada a comparação dos resultados da capacidade de produção de TNF-alfa (intersecção da reta com o eixo y) entre hepatócitos invadidos por *S. Typhimurium* em diferentes concentrações, hepatócitos controle e hepatócitos com estaurosporina. Os resultados das comparações estatísticas das intersecções das retas com o eixo y podem ser vistos na Tabela 17. Os dados transformados em formato “box plot” podem ser observados na figura 23.

Tabela 17 - Comparação entre as capacidades de produção de TNF-alfa dos grupos controle, estaurosporina e *S. Typhimurium*, em diferentes concentrações

Parâmetro	Valor P
Comparação entre grupos por ANOVA one-way	P<0,0001
Controle vs STA ¹	P < 0,05
Controle vs ST 5 x 10 ⁵	P > 0,05 (NS) ²
Controle vs ST 5 x 10 ⁶	P > 0,05 (NS)
Controle vs ST 5 x 10 ⁷	P < 0,01
Controle vs ST 5 x 10 ⁸	P < 0,01
Controle vs ST 5 x 10 ⁹	P < 0,01
Controle vs ST 5 x 10 ¹⁰	P < 0,01
STA vs ST 5 x 10 ⁵	P < 0,01
STA vs ST 5 x 10 ⁶	P < 0,01
STA vs ST 5 x 10 ⁷	P < 0,001
STA vs ST 5 x 10 ⁸	P < 0,001
STA vs ST 5 x 10 ⁹	P < 0,001
STA vs ST 5 x 10 ¹⁰	P < 0,001
ST 5 x 10 ⁵ vs ST 5 x 10 ⁶	P > 0,05 (NS)
ST 5 x 10 ⁵ vs ST 5 x 10 ⁷	P < 0,01
ST 5 x 10 ⁵ vs ST 5 x 10 ⁸	P < 0,001
ST 5 x 10 ⁵ vs ST 5 x 10 ⁹	P < 0,001
ST 5 x 10 ⁵ vs ST 5 x 10 ¹⁰	P < 0,001
ST 5 x 10 ⁶ vs ST 5 x 10 ⁷	P < 0,01
ST 5 x 10 ⁶ vs ST 5 x 10 ⁸	P < 0,001
ST 5 x 10 ⁶ vs ST 5 x 10 ⁹	P < 0,001

continua

Parâmetro	Valor P
ST 5 x 10 ⁶ vs ST 5 x 10 ¹⁰	P < 0,001
ST 5 x 10 ⁷ vs ST 5 x 10 ⁸	P < 0,001
ST 5 x 10 ⁷ vs ST 5 x 10 ⁹	P < 0,05
ST 5 x 10 ⁷ vs ST 5 x 10 ¹⁰	P < 0,05
ST 5 x 10 ⁸ vs ST 5 x 10 ⁹ A	P < 0,001
ST 5 x 10 ⁸ vs ST 5 x 10 ¹⁰	P < 0,001
ST 5 x 10 ⁹ vs ST 5 x 10 ¹⁰	P > 0,05 (NS)

NOTA: ¹ Todas as comparações contra controle foram feitas pelo teste de comparação múltipla de Dunnett; ² NS = não significativo; ³ Todas as comparações entre os demais grupos de bactérias versus estaurosporina (STA), e dos grupos entre si, foram feitas pelo teste de comparação múltipla de Newman-Keuls.

Figura 23 - Aplicação do Teste de Dunnett, comparando as capacidades de produção de TNF-alfa entre hepatócitos controle e invadidos por *S. Typhimurium* nas concentrações 5×10^5 - 5×10^{10}
NOTA: STA: estaurosporina (200ng/mL); ST: *Salmonella Typhimurium*

A figura 23 mostra que houve diferenças significativas na capacidade de produção de TNF-alfa entre o grupo controle e hepatócitos invadidos por *S. Typhimurium* nas concentrações 5×10^7 a 5×10^{10} . Na concentração 5×10^8 de *S. Typhimurium*, os hepatócitos invadidos apresentaram maior capacidade de produção de TNF-alfa. Todos os grupos de ST foram diferentes do grupo estaurosporina. O grupo ST 5×10^5 mostrou capacidade de produção de TNF-alfa menor em relação aos demais grupos, com exceção de ST 5×10^6 . O grupo ST 5×10^6 mostrou capacidade de produção de TNF-alfa menor em relação às concentrações maiores de ST, o mesmo acontecendo com os grupos ST 5×10^7 e 5×10^8 . Não houve diferença entre os grupos ST 5×10^9 e 5×10^{10} .

4.5.12. Teste de comparação múltipla de Dunnett entre as capacidades de produção de TNF-alfa do grupo *L. monocytogenes* 4a em diferentes concentrações

Foi realizada a comparação dos resultados da capacidade de produção de TNF-alfa (intersecção da reta com o eixo y) entre hepatócitos invadidos por *L.monocytogenes* 4a em diferentes concentrações, hepatócitos controle e hepatócitos com estaurosporina. Os resultados das comparações estatísticas das intersecções das retas com o eixo y podem ser vistos na tabela 18. Os dados transformados em formato “box plot” podem ser observados na figura 24.

Tabela 18 - Comparação entre as capacidades de produção de TNF-alfa dos grupos controle, estaurosporina e *L. monocytogenes* 4a, em diferentes concentrações

Parâmetro	Valor P
Comparação entre grupos por ANOVA one-way	P<0,0001
Controle vs STA ¹	P < 0,01
Controle vs LM 4a 5x10 ⁵	P < 0,01
Controle vs LM 4a 5 x 10 ⁶	P > 0,05 (NS) ²
Controle vs LM 4a 5 x 10 ⁷	P > 0,05 (NS)
Controle vs LM 4a 5 x 10 ⁸	P > 0,05 (NS)
Controle vs LM 4a 5 x 10 ⁹	P < 0,01
Controle vs LM 4a 5 x 10 ¹⁰	P < 0,01
STA vs LM 4a 5 x 10 ⁵	P < 0,001 ³
STA vs LM 4a 5 x 10 ⁶	P < 0,001
STA vs LM 4a 5 x 10 ⁷	P < 0,001
STA vs LM 4a 5 x 10 ⁸	P < 0,001
STA vs LM 4a 5 x 10 ⁹	P < 0,001
STA vs LM 4a 5 x 10 ¹⁰	P < 0,001
LM 4a 5 x 10 ⁵ vs LM 4a 5 x 10 ⁶	P > 0,05 (NS)
LM 4a 5 x 10 ⁵ vs LM 4a 5 x 10 ⁷	P > 0,05 (NS)
LM 4a 5 x 10 ⁵ vs LM 4a 5 x 10 ⁸	P > 0,05 (NS)
LM 4a 5 x 10 ⁵ vs LM 4a 5 x 10 ⁹	P < 0,001
LM 4a 5 x 10 ⁵ vs LM 4a 5x10 ¹⁰	P < 0,05
LM 4a 5x10 ⁶ vs LM 4a 5 x 10 ⁷	P > 0,05 (NS)
LM 4a 5x10 ⁶ vs LM 4a 5 x 10 ⁸	P > 0,05 (NS)
LM 4a 5x10 ⁶ vs LM 4a 5 x 10 ⁹	P < 0,001
LM 4a 5x10 ⁶ vs LM 4a 5 x 10 ¹⁰	P < 0,001
LM 4a 5 x 10 ⁷ vs LM 4a 5 x 10 ⁸	P > 0,05 (NS)
LM 4a 5 x 10 ⁷ vs LM 4a 5 x 10 ⁹	P < 0,001
LM 4a 5 x 10 ⁷ vs LM 4a 5 x 10 ¹⁰	P < 0,001
LM 4a 5 x 10 ⁸ vs LM 4a 5 x 10 ⁹	P < 0,001
LM 4a 5 x 10 ⁸ vs LM 4a 5 x 10 ¹⁰	P < 0,01
LM 4a 5 x 10 ⁹ vs LM 4a 5 x 10 ¹⁰	P < 0,001

NOTA: ¹ Todas as comparações contra controle foram feitas pelo teste de comparação múltipla de Dunnett; ² NS = não significativo; ³ Todas as comparações entre os demais grupos de bactérias versus estaurosporina (STA), e dos grupos entre si, foram feitas pelo teste de comparação múltipla de Newman-Keuls.

Figura 24 - Aplicação do Teste de Dunnett, comparando as capacidades de produção de TNF-alfa entre hepatócitos controle e invadidos por *L. monocytogenes* 4a nas concentrações 5×10^5 - 5×10^{10}
NOTA: STA: estaurosporina (200ng/mL); LM: *Listeria monocytogenes*

Os resultados mostraram que houve diferenças significativas na capacidade de produção de TNF-alfa entre o grupo controle e *L. monocytogenes* 4a nas concentrações 5×10^5 , 5×10^9 e 5×10^{10} . Na concentração de LM 4a 5×10^9 os hepatócitos invadidos apresentaram maior capacidade para produzir TNF-alfa. Houve diferenças significativas entre STA e LM 4a em todas as concentrações, bem como entre LM 4a 5×10^5 versus 5×10^9 e 5×10^{10} , e entre LM 4a 5×10^6 versus 5×10^9 e 5×10^{10} . Também houve diferença entre LM 4a 5×10^7 versus 5×10^9 e 5×10^{10} , e entre 5×10^8 e 5×10^9 . A concentração de 5×10^{10} mostrou resultados superiores de capacidade de produção de TNF-alfa em relação a todas as concentrações inferiores.

4.5.13. Teste de comparação múltipla de Dunnett entre as capacidades de produção de TNF-alfa do grupo *L. monocytogenes* 4b em diferentes concentrações

Foi realizada a comparação dos resultados da capacidade de produção de TNF-alfa (intersecção da reta com o eixo y) entre hepatócitos invadidos por *L. monocytogenes* 4b em diferentes concentrações, hepatócitos controle e hepatócitos com estaurosporina. Os resultados das comparações estatísticas das intersecções das retas com o eixo y podem ser vistos na

tabela 19. Os dados transformados em formato “box plot” podem ser observados na figura 25.

Tabela 19 - Comparação entre as capacidades de produção de TNF-alfa dos grupos controle, estaurosporina e *L. monocytogenes* 4b, em diferentes concentrações

Parâmetro	Valor P
Análise de variância One-way	P < 0,0001
Controle vs STA ¹	P < 0,01
Controle vs LM 4b 5x10 ⁵	P < 0,01
Controle vs LM 4b 5 x 10 ⁶	P > 0,05 (NS) ²
Controle vs LM 4b 5 x 10 ⁷	P > 0,05 (NS)
Controle vs LM 4b 5 x 10 ⁸	P > 0,05 (NS)
Controle vs LM 4b 5 x 10 ⁹	P > 0,05 (NS)
Controle vs LM 4b 5 x 10 ¹⁰	P < 0,01
STA vs LM 4b 5x10 ⁵	P < 0,001 ³
STA vs LM 4b 5x10 ⁶	P < 0,001
STA vs LM 4b 5x10 ⁷	P < 0,001
STA vs LM 4b 5x10 ⁸	P < 0,001
STA vs LM 4b 5x10 ⁹	P < 0,001
STA vs LM 4b 5 x 10 ¹⁰	P < 0,001
LM 4b 5 x 10 ⁵ vs LM 4b 5 x 10 ⁶	P < 0,05
LM 4b 5 x 10 ⁵ vs LM 4b 5 x 10 ⁷	P < 0,001
LM 4b 5 x 10 ⁵ vs LM 4b 5 x 10 ⁸	P < 0,001
LM 4b 5 x 10 ⁵ vs LM 4b 5 x 10 ⁹	P < 0,001
LM 4b 5 x 10 ⁵ vs LM 4b 5 x 10 ¹⁰	P < 0,001
LM 4b 5 x 10 ⁶ vs LM 4b 5 x 10 ⁷	P > 0,05 (NS)
LM 4b 5 x 10 ⁶ vs LM 4b 5 x 10 ⁸	P < 0,05
LM 4b 5 x 10 ⁶ vs LM 4b 5 x 10 ⁹	P > 0,05 (NS)
LM 4b 5 x 10 ⁶ vs LM 4b 5 x 10 ¹⁰	P < 0,001
LM 4b 5 x 10 ⁷ vs LM 4b 5 x 10 ⁸	P > 0,05 (NS)
LM 4b 5 x 10 ⁷ vs LM 4b 5x10 ⁹	P > 0,05 (NS)
LM 4b 5 x 10 ⁷ vs LM 4b 5 x 10 ¹⁰	P < 0,001
LM 4b 5 x 10 ⁸ vs LM 4b 5 x 10 ⁹	P > 0,05 (NS)
LM 4b 5 x 10 ⁸ vs LM 4b 5 x 10 ¹⁰	P < 0,001
LM 4b 5 x 10 ⁹ vs LM 4b 5 x 10 ¹⁰	P < 0,001

NOTA: ¹ Todas as comparações contra controle foram feitas pelo teste de comparação múltipla de Dunnett; ² NS = não significativo; ³ Todas as comparações entre os demais grupos de bactérias versus estaurosporina (STA), e dos grupos entre si, foram feitas pelo teste de comparação múltipla de Newman-Keuls.

Figura 25 - Aplicação do Teste de Dunnett, comparando as capacidades de produção de TNF-alfa entre hepatócitos controle e invadidos por *L. monocytogenes* 4b nas concentrações 5×10^5 - 5×10^{10}
NOTA: STA: estaurosporina (200ng/mL); LM: *Listeria monocytogenes*

A análise dos resultados mostrou diferenças significativas na capacidade de produção de TNF-alfa entre o grupo controle e o grupo com *L. monocytogenes* 4b, apenas nas concentrações 5×10^5 e 5×10^{10} . Na concentração 5×10^{10} de *L. monocytogenes* 4b, as células invadidas apresentaram maior capacidade para produzir TNF-alfa. Houve diferenças significativas entre STA e LM 4b em todas as concentrações, bem como entre LM 4b 5×10^5 e todas as concentrações acima. Na comparação entre a concentração LM 4b 5×10^6 , e as concentrações superiores, só houve diferença com 5×10^8 e 5×10^{10} . A mesma comparação para LM 4b 5×10^7 só mostrou diferença com 5×10^{10} , o mesmo resultado apresentado pela concentração LM 4b 5×10^8 . Novamente LM 4b 5×10^{10} foi diferente de todas as concentrações inferiores.

4.5.14. Teste de comparação múltipla de Dunnett entre as capacidades de produção de TNF-alfa do grupo *L. monocytogenes* 1/2a em diferentes concentrações

Foi realizada a comparação dos resultados da capacidade de produção de TNF-alfa (intersecção da reta com o eixo y) entre hepatócitos invadidos por *L.monocytogenes* 1/2a em diferentes concentrações, hepatócitos controle e hepatócitos com estaurosporina. Os resultados das comparações estatísticas das intersecções das retas com o eixo y podem ser vistos na

tabela 20. Os dados transformados em formato “box plot” podem ser observados na figura 26.

Tabela 20 - Comparação entre as capacidades de produção de TNF-alfa dos grupos controle, estaurosporina e *L. monocytogenes* 1/2a em diferentes concentrações

Parâmetro	Valor P
Análise de variância One-way	$P < 0,0001$
Controle vs STA ¹	$P < 0,01$
Controle vs LM 1/2a 5×10^5	$P > 0,05$ (NS) ²
Controle vs LM 1/2a 5×10^6	$P > 0,05$ (NS)
Controle vs LM 1/2a 5×10^7	$P > 0,05$ (NS)
Controle vs LM 1/2a 5×10^8	$P > 0,05$ (NS)
Controle vs LM 1/2a 5×10^9	$P > 0,05$ (NS)
Controle vs LM 1/2a 5×10^{10}	$P > 0,05$ (NS)
STA vs LM 1/2a 5×10^5	$P < 0,01$ ³
STA vs LM 1/2a 5×10^6	$P < 0,001$
STA vs LM 1/2a 5×10^7	$P < 0,001$
STA vs LM 1/2a 5×10^8	$P < 0,001$
STA vs LM 1/2a 5×10^9	$P < 0,001$
STA vs LM 1/2a 5×10^{10}	$P < 0,01$
LM 1/2a 5×10^5 vs LM 1/2a 5×10^6	$P > 0,05$ (NS)
LM 1/2a 5×10^5 vs LM 1/2a 5×10^7	$P > 0,05$ (NS)
LM 1/2a 5×10^5 vs LM 1/2a 5×10^8	$P > 0,05$ (NS)

continua

Parâmetro	Valor P
LM 1/2a 5 x 10 ⁵ vs LM 1/2a 5 x 10 ⁹	P > 0,05 (NS)
LM 1/2a 5 x 10 ⁵ vs LM 1/2a 5x10 ¹⁰	P > 0,05 (NS) ²
LM 1/2a 5 x 10 ⁶ vs LM 1/2a 5 x 10 ⁷	P > 0,05 (NS)
LM 1/2a 5 x 10 ⁶ vs LM 1/2a 5 x 10 ⁸	P > 0,05 (NS)
LM 1/2a 5 x 10 ⁶ vs LM 1/2a 5 x 10 ⁹	P > 0,05 (NS)
LM 1/2a 5 x 10 ⁶ vs LM 1/2a 5x10 ¹⁰	P > 0,05 (NS)
LM 1/2a 5 x 10 ⁷ vs LM 1/2a 5 x 10 ⁸	P > 0,05 (NS)
LM 1/2a 5 x 10 ⁷ vs LM 1/2a 5 x 10 ⁹	P > 0,05 (NS)
LM 1/2a 5 x 10 ⁷ vs LM 1/2a 5 x 10 ¹⁰	P > 0,05 (NS)
LM 1/2a 5 x 10 ⁸ vs LM 1/2a 5 x 10 ⁹	P > 0,05 (NS)
LM 1/2a 5 x 10 ⁸ vs LM 1/2a 5 x 10 ¹⁰	P > 0,05 (NS)
LM 1/2a 5 x 10 ⁹ vs LM 1/2a 5x10 ¹⁰	P > 0,05 (NS)

NOTA: ¹ Todas as comparações contra controle foram feitas pelo teste de comparação múltipla de Dunnett; ² NS = não significativo; ³ Todas as comparações entre os demais grupos de bactérias versus estaurosporina (STA), e dos grupos entre si, foram feitas pelo teste de comparação múltipla de Newman-Keuls;.

Figura 26 - Aplicação do Teste de Dunnett, comparando as capacidades de produção de TNF-alfa entre hepatócitos controle e invadidos por *L. monocytogenes* 1/2a nas concentrações 5×10^5 - 5×10^{10}
NOTA: STA: estaurosporina (200ng/mL); LM: *Listeria monocytogenes*

Na figura 26 podemos observar que não houve diferenças significativas na capacidade de produção de TNF-alfa pelos hepatócitos invadidos, entre o grupo controle e as diversas concentrações analisadas da bactéria LM 1/2a. Houve apenas diferença significativa entre o grupo controle e o grupo estaurosporina. Portanto, em nenhuma concentração de *L. monocytogenes* 1/2a os hepatócitos mostraram capacidade diferenciada de produzir TNF-alfa. Houve diferenças significativas entre o grupo STA e todas as concentrações de LM 1/2a.

4.5.15. Teste de comparação múltipla de Dunnett entre as capacidades de produção de TNF-alfa dos grupos controle, estaurosporina, *S. Typhimurium* e *L. monocytogenes* 4a, 4b e 1/2a na concentração 5×10^{10}

Foi realizada a comparação dos resultados da capacidade de produção de TNF-alfa (intersecção da reta com o eixo y) entre hepatócitos invadidos por *S. Typhimurium*, *L. monocytogenes* (4a, 4b e 1/2a), hepatócitos controle e hepatócitos estimulados com estaurosporina, fixando a concentração das bactérias em 5×10^{10} . Os resultados das comparações estatísticas das intersecções das retas com o eixo y podem ser vistos na tabela 21. Os dados transformados em formato “box plot” podem ser observados na figura 27.

Tabela 21 - Comparação entre as capacidades de produção de TNF-alfa dos grupos controle, estaurosporina, *S. Typhimurium* e *L. monocytogenes*, em diferentes concentrações

Parâmetro	Valor P
Análise de variância One-way	P < 0,0001
Controle vs STA	P > 0,05 (NS) ¹
Controle vs ST 5 x 10 ¹⁰	P < 0,001
Controle vs LM 4a 5 x 10 ¹⁰	P < 0,01
Controle vs LM 4b ² 5 x 10 ¹⁰	P < 0,001
Controle vs LM 1/2a 5 x 10 ¹⁰	P > 0,05
STA ³ vs ST 5 x 10 ¹⁰	P < 0,001
STA vs LM 4a 5 x 10 ¹⁰	P < 0,001
STA vs LM 4b ² 5 x 10 ¹⁰	P < 0,001
STA vs LM 1/2a 5 x 10 ¹⁰	P > 0,05 (NS)
ST 5 x 10 ¹⁰ vs LM 4a 5 x 10 ¹⁰	P > 0,05 (NS)
ST 5 x 10 ¹⁰ vs LM 4b ² 5 x 10 ¹⁰	P < 0,05
ST 5 x 10 ¹⁰ vs LM 1/2a 5 x 10 ¹⁰	P < 0,001
LM 4a 5 x 10 ¹⁰ vs LM 4b ² 5 x 10 ¹⁰	P < 0,01
LM 4a 5 x 10 ¹⁰ vs LM 1/2a 5 x 10 ¹⁰	P < 0,01
LM 4b ² 5 x 10 ¹⁰ vs LM 1/2a 5 x 10 ¹⁰	P < 0,001

NOTA: ¹ NS = não significativo; ² Todas as comparações contra LM 4b foram feitas pelo teste de comparação múltipla de Dunnett; ³ Todas as comparações entre os demais grupos de bactérias versus estaurosporina (STA) e entre si foram feitas pelo teste de comparação múltipla de Newman-Keuls;.

Figura 27 - Aplicação do Teste de Dunnett, comparando as capacidades de produção de TNF-alfa entre hepatócitos invadidos por *S. Typhimurium* e *L. monocytogenes* 4a, 4b e 1/2a na concentração 5×10^{10}

NOTA: STA: estaurosporina (200ng/mL); ST: *Salmonella Typhimurium*; LM: *Listeria monocytogenes*

A análise estatística da comparação entre os vários grupos versus o grupo LM 4b (capacidade para liberação de TNF-alfa), indicou que havia diferença significativa quanto às capacidades de produção de TNF-alfa entre o grupo LM 4b e os grupos: controle, estaurosporina, LM 4a, e LM 1/2a. Houve também diferença significativa entre LM 4b e o grupo *S. Typhimurium*. Contra estaurosporina houve diferença significativa para os grupos: ST 5×10^{10} , LM 4a 5×10^{10} e LM 4b 5×10^{10} . O grupo ST 5×10^{10} só

não foi diferente de LM 4a 5×10^{10} . Entre as cepas de *Listeria* houve diferenças em todas as comparações.

4.5.16. Avaliação do melhor tempo de incubação através da média da linearidade entre *S. Typhimurium* e *L. monocytogenes* (4a, 4b e 1/2a)

A comparação entre os tempos de incubação de 1h a 6h para hepatócitos invadidos por *S. Typhimurium* e *L. monocytogenes* (4a, 4b e 1/2a), hepatócitos controle e hepatócitos estimulados com estaurosporina, podem ser vistos na tabela 22 e na figura 28.

Tabela 22 - Comparação entre tempos de incubação através da média da linearidade

	1h	2h	3h	4h	5h	6h	
r^2	0,9647	0,9615	0,804	0,8087	0,9394	0,9647	ST (linear)
r^2	0,9258	0,9102	0,6683	0,9481	0,8929	0,9138	LM 4a (linear)
r^2	0,8359	0,9341	0,9502	0,8206	0,6377	0,5172	LM 4b (linear)
r^2	0,9128	0,812	0,9765	0,9747	0,9706	0,9707	LM 1/2a (linear)
r^2	0,91	0,90	0,85	0,89	0,86	0,84	Média da linearidade

NOTA: Controle - $r^2=0,1265$; STA - $r^2=0,2466$

Figura 28 - Gráfico da variação da média da linearidade entre 1h e 6h de incubação das diferentes cepas bacterianas com hepatócitos

A análise da média de linearidade mostrou que todos os tempos de incubação foram capazes de diferenciar significativamente a liberação de TNF-alfa.

4.6. Apoptose quantificada pela técnica TUNEL através de citometria de fluxo, entre os grupos controle, estaurosporina, *S. Typhimurium* e *L. monocytogenes* 4a, 4b e 1/2a

Os dados de apoptose obtidos pela técnica TUNEL de forma descritiva (tabela 23 e figuras 29 a 33) estão agrupados nos Apêndices I e II respectivamente. Não houve linearidade para os números absolutos pelo método estatístico da regressão linear, e a comparação estatística entre

grupos por essa via não foi possível ser feita. Entretanto, houve linearidade entre os grupos de apoptose pelos métodos TUNEL e Anexina quando foi considerada a área sob a curva para cada experimento, sendo a área calculada tendo no eixo x o tempo, e no eixo y a quantificação da apoptose. Estes resultados são mostrados a seguir.

4.6.1. Comparação entre as taxas de apoptose dos hepatócitos induzidas por *S.Typhimurium* e *L. monocytogenes* 4a, 4b e 1/2a

Foi realizada a comparação das taxas de apoptose (inclinação da reta), quantificada pelo método TUNEL, dos hepatócitos invadidos por *S. Typhimurium* e *L. monocytogenes* 4a, 4b e 1/2a. Os resultados exibidos em gráfico com formato “box plot” podem ser vistos na figura 34. Os números completos estão disponíveis nas tabelas 24 e 25.

Tabela 24 – Média e desvio-padrão das taxas de apoptose dos hepatócitos invadidos por *S. Typhimurium* e *L. monocytogenes* (4a, 4b e 1/2a)

ST			LM 4a			LM 4b			LM 1/2a		
média	desvio padrão	n	média	desvio padrão	n	média	desvio padrão	n	média	desvio padrão	n
23,86	1,614	6	15,91	0,9343	6	21,14	1,421	6	23,93	1,263	6

NOTA: UA (unidade de área); método TUNEL; $P < 0,0001$ (ANOVA)

Tabela 25 – Comparação entre taxas de apoptose pelo pós-teste Student-Newman-Keuls

Teste de múltipla comparação Newman-Keuls	Valor P
ST vs LM 1/2a	$P > 0,05$ (NS) ¹
LM 4a vs ST	$P < 0,001$
LM 4a vs LM 4b	$P < 0,001$
LM 4a vs LM 1/2a	$P < 0,001$
LM 4b vs ST	$P < 0,01$
LM 4b vs LM 1/2a	$P < 0,01$

NOTA: ¹ (NS)=não significativo

Figura 34 – Comparação entre taxas de apoptose induzidas por *S. Typhimurium* e *L. monocytogenes* 4a, 4b e 1/2a (método TUNEL)

Podemos observar que *S. Typhimurium* e *L. monocytogenes* 1/2a produziram as maiores taxas de apoptose dos hepatócitos entre as bactérias pesquisadas, não havendo diferença entre as duas. A taxa de apoptose de *L. monocytogenes* 4b teve padrão intermediário, enquanto *L. monocytogenes* 4a induziu a menor taxa de apoptose. Houve significância entre os valores das taxas de apoptose dos grupos entre si ($p \leq 0,01$). Apenas entre os grupos ST e 1/2a não houve diferença significativa ($P > 0,05$).

4.6.2. Comparação entre as capacidades de apoptose dos hepatócitos induzidas por *S. Typhimurium* e *L. monocytogenes* 4a, 4b e 1/2a

Foi realizada a comparação dos resultados da capacidade de apoptose (intersecção do eixo y) entre hepatócitos invadidos por *S. Typhimurium* e *L. monocytogenes* 4a, 4b e 1/2a. Os resultados mostrados em gráfico em formato “box plot” podem ser vistos na figura 35. Os números completos podem ser observados nas tabelas 26 e 27.

Tabela 26 – Média e desvio-padrão das capacidades de apoptose dos hepatócitos invadidos por *S. Typhimurium* e *L. monocytogenes* (4a, 4b e 1/2a)

ST			LM 4a			LM 4b			LM 1/2a		
média	desvio padrão	n	média	desvio padrão	n	média	desvio padrão	n	média	desvio padrão	n
-50,67	12,42	6	10,81	7,186	6	-17,22	10,93	6	-40,27	9,712	6

NOTA: UA (unidade de área); método TUNEL; $P < 0,0001$ (ANOVA)

Tabela 27 - Comparação entre as capacidades de apoptose pelo pós-teste Student-Newman-Keuls

Teste de múltipla comparação de Newman-Keuls	Valor P
ST vs LM 4a	$P < 0,001$
ST vs LM 4b	$P < 0,001$
ST vs LM 1/2a	$P > 0,05$ (NS) ¹
LM 4b vs LM 4a	$P < 0,001$
LM 1/2a vs LM 4a	$P < 0,001$
LM 1/2a vs LM 4b	$P < 0,001$

NOTA: ¹ (NS)=não significativo

Figura 35 - Comparação entre as capacidades de apoptose dos hepatócitos induzidas por *S. Typhimurium* e *L. monocytogenes* 4a, 4b e 1/2a

A capacidade máxima de indução de apoptose, avaliada pelo método TUNEL, foi encontrada com *S. Typhimurium*.

Valores decrescentes foram encontrados com LM 1/2a, seguida da LM 4b e LM 4a. Houve significância entre os valores das taxas de apoptose dos grupos entre si ($p \leq 0,001$). Apenas entre os grupos ST e LM 1/2a não houve diferença significativa ($p \geq 0,05$).

4.7. Apoptose estimada pela técnica de Anexina por Citometria de Fluxo, em hepatócitos invadidos por *S. Typhimurium* e *L. monocytogenes* 4a, 4b e 1/2a

Na figura 36 temos um quadro representativo das porcentagens de células em apoptose, necrose e apoptose tardia, obtidos pela marcação com anexina-FITC dos hepatócitos invadidos por *S. Typhimurium* e *L. monocytogenes*.

Os dados de apoptose por Anexina foram apresentados de forma (tabela 28 e figuras 37 a 41) descritiva estão agrupados nos Apêndices I e II respectivamente. Não houve linearidade para os números absolutos pelo método estatístico da regressão linear, e a comparação estatística entre grupos por essa via não foi possível ser feita. Entretanto, houve linearidade entre os grupos de apoptose pelos métodos TUNEL e Anexina quando foi considerada a área sob a curva para cada experimento, sendo a área

calculada tendo no eixo x o tempo, e no eixo y a quantificação da apoptose.

Estes resultados são mostrados a seguir.

Figura 36 – Análise por citometria de fluxo de hepatócitos marcados com anexina V-FITC invadidos por ST (A), LM 4a (B), LM 4b (C) e LM 1/2a (D). Quadrante inferior direito de cada figura = % de apoptose; quadrante superior esquerdo = % de necrose; quadrante superior direito = % de apoptose tardia.

4.7.1. Avaliação estatística das taxas de apoptose estimadas pela técnica da anexina, em hepatócitos invadidos por *S. Typhimurium* e *L. monocytogenes* (4a, 4b e 1/2a)

Foi realizada a comparação dos resultados da taxa de apoptose (inclinação da reta) entre hepatócitos invadidos por *S. Typhimurium* e *L. monocytogenes* 4a, 4b e 1/2a. Os resultados mostrados em gráfico em formato “box plot” podem ser vistos na figura 42 . Os números completos estão nas tabelas 29 e 30.

Tabela 29 – Média e desvio-padrão das taxas de apoptose dos hepatócitos invadidos por *S. Typhimurium* e *L. monocytogenes* (4a, 4b e 1/2a)

APOPTOSE	ST	LM 4a	LM 4b	LM 1/2a
Taxa (Inclinação da reta)	12.51 ± 2.052	23.10 ± 3.481	26.61 ± 3.414	18.57 ± 2.497
r ²	0,90	0,92	0,94	0,93

NOTA: UA (unidade de área); método Anexina (regressão linear da área sob a curva); P<0,0001 (análise da variância one-way)

Tabela 30 - Comparação entre as taxas de apoptose pelo pós-teste Student-Newman-Keuls

Newman-Keuls	Valor P
ST vs LM 4b	P < 0,05
LM 4a vs ST	P < 0,001
LM 4a vs LM 4b	P < 0,001
LM 4a vs LM 1/2a	P < 0,001
LM 1/2a vs ST	P > 0,05 (NS) ¹
LM 1/2a vs LM 4b	P < 0,01

NOTA: ¹ (NS)=não significativo

Figura 42 – Comparação entre as taxas de apoptose de hepatócitos induzidas por *S. Typhimurium* e *L. monocytogenes* 4a, 4b e 1/2a (anexina).

Podemos observar, através da técnica da anexina, que *L. monocytogenes* 4b produziu apoptose em taxa maior que *L. monocytogenes* 4a e *L. monocytogenes* 1/2a. A menor taxa de apoptose foi registrada com *S. Typhimurium*. Todos os grupos apresentaram diferença significativa entre si, quanto às taxas de apoptose ($p \leq 0,05$), com exceção do grupo *S. Typhimurium* versus *L. monocytogenes* 1/2a ($P > 0,05$).

4.7.2. Avaliação estatística das capacidades de apoptose em hepatócitos invadidos por *S. Typhimurium* e *L. monocytogenes* 4a, 4b e 1/2a

Foi realizada a comparação dos resultados da capacidade de apoptose entre hepatócitos invadidos por *S. Typhimurium* e *L. monocytogenes* 4a, 4b e 1/2a. Os resultados mostrados em gráfico em formato “box plot” podem ser vistos na figura 43. Os números completos estão nas tabelas 31 e 32.

Tabela 31 – Média e desvio-padrão das capacidades de apoptose dos hepatócitos invadidos por *S. Typhimurium* e *L. monocytogenes* (4a, 4b e 1/2a)

APOPTOSE	ST	LM 4a	LM 4b	LM 1/2a
Capacidade (Intersecção eixo y)	-63.31 ± 15.79	-126.4 ± 26.78	-142.0 ± 26.26	-97.75 ± 19.21
r ²	0,90	0,92	0,94	0,93

NOTA: valores expressos em média ± desvio padrão de UA (unidade de área); método Anexina; aplicada regressão linear da área sob a curva; P<0,0001 (análise da variância one-way)

Tabela 32 - Comparação entre as capacidades de apoptose pelo pós-teste Student-Newman-Keuls

Newman-Keuls	Valor P
ST vs LM 4a	P < 0,001
ST vs LM 1/2a	P < 0,01
LM 4b vs ST	P < 0,05
LM 4b vs LM 4a	P < 0,001
LM 4b vs LM 1/2a	P < 0,01
LM 1/2a vs LM 4a	P > 0,05 (NS) ¹

NOTA: ¹ (NS)=não significativo

Figura 43 – Comparação entre as capacidades de apoptose de hepatócitos induzidas por *S. Typhimurium* e *L. monocytogenes* 4a, 4b e 1/2a (anexina).

Podemos observar, através da técnica da anexina, que *L. monocytogenes* 4b mostrou maior capacidade de indução de apoptose em hepatócitos. Em ordem decrescente detectamos capacidade de apoptose para *L. monocytogenes* 4a, *L. monocytogenes* 1/2a e *S. Typhimurium*. Houve diferenças significativas entre os vários grupos ($p \leq 0,05$) exceto entre os grupos *L. monocytogenes* 4a e *L. monocytogenes* 1/2a ($P > 0,05$).

4.7.3. Avaliação estatística das taxas de necrose estimadas pela técnica da anexina, em hepatócitos invadidos por *S. Typhimurium* e *L. monocytogenes*

Foi realizada a comparação dos resultados da taxa (inclinação da reta) da ocorrência de necrose entre hepatócitos invadidos por *S. Typhimurium*, *L. monocytogenes* 4a, 4b e 1/2a. Os resultados mostrados em gráfico em formato “box plot” podem ser vistos na figura 44. Os números completos estão nas tabelas 33 e 34.

Tabela 33 – Média e desvio-padrão das taxas de necrose de hepatócitos invadidos por *S. Typhimurium* e *L. monocytogenes* (4a, 4b e 1/2a)

NECROSE	ST	LM 4a	LM 4b	LM 1/2a
Taxa (Inclinação da reta)	2.315 ± 2.068	-5.078 ± 4.399	6.369 ± 1.360	1.181 ± 1.368
r ²	0,2386	0,2499	0,8458	0,1572

NOTA: valores expressos em média ± desvio padrão de UA (unidade de área); método Anexina; aplicada regressão linear da área sob a curva; P<0,0001 (análise da variância one-way)

Tabela 34 - Comparação entre as taxas de necrose pelo pós-teste Student-Newman-Keuls

Newman-Keuls	Valor P
ST vs LM 4a	P < 0,001
ST vs LM 4b	P < 0,001
ST vs LM 1/2a	P < 0,01
LM 4a vs LM 4b	P > 0,05 (NS) ¹
LM 1/2a vs LM 4a	P < 0,05
LM 1/2a vs LM 4b	P < 0,001

NOTA: ¹ (NS)=não significativo; P<0,0001 (análise de variância one-way)

Figura 44 – Comparação entre as taxas de necrose de hepatócitos induzidos por *S. Typhimurium* e *L. monocytogenes* 4a, 4b e 1/2a (anexina)

Podemos observar, através da técnica da anexina, que *L. monocytogenes* 4b produziu necrose em maior taxa em relação a todas as outras cepas de *L. monocytogenes*. Em ordem decrescente tivemos as taxas de indução de necrose com *L. monocytogenes* 4a, *S. Typhimurium* e *L.*

monocytogenes 1/2a. Houve significância estatística entre todos os grupos ($p \leq 0,05$) exceto entre os grupos *L. monocytogenes* 4a e 4b ($P > 0,05$).

4.7.4. Avaliação estatística das capacidades de necrose, estimadas pela técnica da anexina, em hepatócitos invadidos por *S. Typhimurium* e *L. monocytogenes*

Foi realizada a comparação dos resultados da capacidade de indução de necrose (intersecção com eixo y) entre hepatócitos invadidos por *S. Typhimurium*, *L. monocytogenes* 4a, 4b e 1/2a. Os resultados em gráfico no formato “box plot” podem ser vistos na figura 45. Os números completos estão nas tabelas 35 e 36.

Tabela 35 – Média e desvio-padrão das capacidades de necrose dos hepatócitos invadidos por *S. Typhimurium* e *L. monocytogenes* (4a, 4b e 1/2a)

NECROSE	ST	LM 4a	LM 4b	LM 1/2a
Capacidade (intersecção eixo y)	39.70 ± 15.91	94.08 ± 33.83	11.39 ± 10.46	49.62 ± 10.52
r ²	0,2386	0,2499	0,8458	0,1572

NOTA: Valores expressos em média ± desvio padrão de UA (unidade de área); método Anexina; aplicada regressão linear da área sob a curva; $P < 0,0001$ (análise da variância one-way)

Tabela 36 - Comparação entre as capacidades de necrose pelo pós-teste Student-Newman-Keuls

Pós-teste de Newman-Keuls	Valor P
LM 4a vs ST	$P < 0,001$
LM 4a vs LM 1/2a	$P < 0,05$
LM 4b vs ST	$P < 0,001$
LM 4b vs LM 4a	$P < 0,05$
LM 4b vs LM 1/2a	$P < 0,01$
LM 1/2a vs ST	$P > 0,05$ (NS) ¹

NOTA: ¹ (NS)=não significativo

Figura 45 – Comparação entre as capacidades de necrose de hepatócitos induzidas por *S. Typhimurium* e *L. monocytogenes* 4a, 4b e 1/2a (anexina)

Podemos observar, através da técnica da anexina, que *L. monocytogenes* 4a mostrou capacidade máxima para produzir necrose em hepatócitos, em relação às demais cepas de *L. monocytogenes*. A

capacidade para necrose foi obtida em ordem decrescente para *L. monocytogenes* 1/2a, *S. Typhimurium*, e *L. monocytogenes* 4b. Houve significância estatística entre todos os grupos ($p \leq 0,05$), exceto entre os grupos *L. monocytogenes* 1/2a e *S. Typhimurium* ($P > 0,05$).

4.7.5. Avaliação estatística das taxas de apoptose tardia estimadas pela técnica da anexina, em hepatócitos invadidos por *S. Typhimurium* e *L. monocytogenes*

Foi realizada a comparação dos resultados da taxa de produção (inclinação da reta) de apoptose tardia ou necrose secundária entre hepatócitos invadidos por *S. Typhimurium*, *L. monocytogenes* 4a, 4b e 1/2a. Os resultados em gráfico no formato “box plot” podem ser vistos na figura 46. Os números completos estão nas tabelas 37 e 38.

Tabela 37 – Média e desvio-padrão das taxas de apoptose tardia dos hepatócitos invadidos por *S. Typhimurium* e *L. monocytogenes* (4a, 4b e 1/2a)

Apoptose Tardia	ST	LM 4a	LM 4b	LM 1/2a
Taxa (inclinação da reta)	11,32 ± 1,048	16,63 ± 1,795	17,99 ± 1,530	12,90 ± 1,145
r ²	0,9669	0,9555	0,9719	0,9669

NOTA: Valores expressos em média ± desvio padrão de UA (unidade de área); método Anexina; aplicada regressão linear da área sob a curva; $P < 0,0001$ (análise da variância one-way)

Tabela 38- Comparação entre as taxas de apoptose tardia dos hepatócitos invadidos por *S. Typhimurium* e *L. monocytogenes* (4a, 4b e 1/2a)

Newman-Keuls	Valor P
ST vs LM 4a	P < 0.001
ST vs LM 4b	P < 0.001
ST vs LM 1/2a	P > 0.05 (NS) ¹
LM 4a vs LM 4b	P > 0.05 (NS) ¹
LM 1/2a vs LM 4a	P < 0.001
LM 1/2a vs LM 4b	P < 0.001

NOTA: ¹ (NS)=não significativo

Figura 46 – Comparação entre as taxas de apoptose tardia de hepatócitos induzidas por *S. Typhimurium* e *L. monocytogenes* 4a, 4b e 1/2a (anexina)

Podemos observar, através da técnica da anexina, que *L. monocytogenes* 4b produziu apoptose tardia em taxa maior que *L. monocytogenes* 4a, seguida de *L. monocytogenes* 1/2a e *S. Typhimurium*. Houve significância estatística entre as taxas de produção de apoptose

tardia em todos os grupos ($P < 0,001$) exceto entre os grupos *S. Typhimurium* e *L. monocytogenes* 1/2a ($P > 0,05$) e entre *L. monocytogenes* 4a e 4b ($P > 0,05$)

4.7.6. Avaliação estatística das capacidades de produção de apoptose tardia, estimadas pela técnica da anexina, em hepatócitos invadidos por *S. Typhimurium* e *L. monocytogenes*

Foi realizada a comparação dos resultados da capacidade de produção (intersecção com eixo y) de apoptose tardia entre hepatócitos invadidos por *S. Typhimurium*, *L. monocytogenes* 4a, 4b e 1/2a. Os resultados em gráfico no formato “box plot” podem ser vistos na figura 47. Os números completos estão nas tabelas 39 e 40.

Tabela 39 – Média e desvio-padrão das capacidades de apoptose tardia dos hepatócitos invadidos por *S. Typhimurium* e *L. monocytogenes* (4a, 4b e 1/2a)

Apoptose Tardia	ST	LM 4a	LM 4b	LM 1/2a
Capacidade (intersecção eixo y)	$-41,76 \pm 8,06$	$-70,18 \pm 13,8$	$-72,31 \pm 11,77$	$-47,86 \pm 8,81$
r^2	0,9669	0,9555	0,9719	0,9694

NOTA: Valores expressos em média $\pm$ desvio padrão de UA (unidade de área); método Anexina; aplicada regressão linear da área sob a curva; $P < 0,0001$ (análise da variância one-way)

Tabela 40 - Comparação entre as capacidades de apoptose tardia dos hepatócitos invadidos por *S. Typhimurium* e *L. monocytogenes* (4a, 4b e 1/2a)

Newman-Keuls	P value
LM 4a vs ST	P < 0.001
LM 4a vs LM 1/2a	P < 0.01
LM 4b vs ST	P < 0.001
LM 4b vs LM 4a	P > 0.05 (NS) ¹
LM 4b vs LM 1/2a	P < 0.01
LM 1/2a vs ST	P > 0.05 (NS) ¹

NOTA: ¹ (NS)=não significativo

Figura 47 – Comparação entre as capacidades de apoptose tardia de hepatócitos induzidas por *S. Typhimurium* e *L. monocytogenes* (anexina)

Podemos observar, através da técnica da anexina, que *L. monocytogenes* 4b teve a maior capacidade de produzir apoptose tardia em hepatócitos invadidos. Em ordem decrescente a seguir temos: *L. monocytogenes* 4a, *L. monocytogenes* 1/2a, e *S. Typhimurium*. Houve

significância estatística entre todos os grupos ($p \leq 0,01$) exceto entre os grupos *L. monocytogenes* 4a e 4b ($P > 0,05$) e *L. monocytogenes* 1/2a e *S. Typhimurium* ($P > 0,05$).

Faremos a seguir um resumo geral dos resultados da liberação de TNF-alfa e produção de apoptose, necrose e apoptose tardia para cada bactéria estudada:

Salmonella Typhimurium

- Maior taxa de TNF-alfa
- Uma das maiores capacidades de produção de TNF-alfa
- Maior taxa de apoptose por TUNEL
- Maior capacidade de produção de apoptose por TUNEL
- Menor taxa e capacidade de produção de necrose
- Menor taxa e capacidades de produção de apoptose tardia

Listeria monocytogenes 4a

- Taxa intermediária de TNF-alfa
- Uma das menores capacidades de produção de TNF-alfa
- A menor taxa de apoptose por TUNEL
- A menor capacidade de produção de apoptose por TUNEL
- Taxa de apoptose por anexina intermediária
- Capacidade de apoptose por anexina intermediária
- Uma das maiores taxas de necrose por anexina

- A maior capacidade de produção de necrose por anexina
- Uma das maiores taxas de apoptose tardia
- Uma das maiores capacidades de apoptose tardia

Listeria monocytogenes 4b

- Taxa intermediária de TNF-alfa
- Maior capacidade de produção de TNF-alfa
- Taxa de apoptose por TUNEL intermediária
- Capacidade de apoptose por TUNEL intermediária
- A maior taxa de apoptose por anexina
- A maior capacidade de apoptose por anexina
- Uma das maiores taxas de necrose por anexina
- A menor capacidade de necrose por anexina
- Uma das maiores taxas de apoptose tardia por anexina
- Uma das maiores capacidades de apoptose tardia por anexina

Listeria monocytogenes 1/2a

- A menor taxa de TNF-alfa
- A menor capacidade de produção de TNF-alfa
- Uma das maiores taxas de apoptose por TUNEL
- Uma das maiores capacidades de apoptose por TUNEL
- Uma das menores taxas de apoptose por anexina
- Capacidade de apoptose por anexina intermediária

- A menor taxa de necrose por anexina
- Capacidade de necrose por anexina intermediária
- Uma das menores taxas de apoptose tardia por anexina
- Uma das menores capacidades de apoptose tardia por anexina

4.8. Análise morfológica de hepatócitos invadidos por *S. Typhimurium* e *L. monocytogenes* 4a, 4b e 1/2a, através de microscopia óptica e microscopia eletrônica

A análise morfológica realizada pela microscopia óptica (MO) e eletrônica (ME) foi efetuada no 6º dia de cultura primária de hepatócitos.

A visão dos hepatócitos controle à microscopia óptica revelou células com bom aspecto, distribuídas em monocamadas, estabelecendo amplo contato entre si. Os hepatócitos apresentavam núcleo grande com nucléolo evidente, sendo alguns binucleados. Sinais de proliferação celular com figuras de mitose foram também observados (figura 48). Na microscopia eletrônica observamos a presença de núcleo redondo com cromatina centralizada, mitocôndrias, vacúolos e retículo endoplasmático típicos (figura 55).

As mudanças morfológicas dos hepatócitos invadidos por bactérias, observadas sob microscopia óptica, foram descritas nas figuras 48 a 54. As alterações morfológicas dos hepatócitos invadidos, observadas sob microscopia eletrônica, foram descritas nas figuras 55 a 61.

Figura 48 - Hepatócitos controle corados com HE e vistos sob microscopia óptica. Muitos são binucleados e mostram figuras de mitose. A monocamada apresenta amplo contato intercelular, como indica a seta (400X).

Figura 49 - Hepatócitos invadidos por *L. monocytogenes* 4a, após 3h de incubação, corados com HE (MOI 5000). Nota-se diminuição do contato entre as células, com ruptura da monocamada, indicado pela seta (200x).

Figura 50 - Hepatócitos invadidos por *Salmonella* Typhimurium, após 4h de incubação, corados com HE (MOI 500). A ruptura da monocamada é evidente comprometendo o contato intercelular, conforme indicação da seta (400x).

Figura 51 - Hepatócitos invadidos por *Listeria monocytogenes* 4b após 1h de incubação, corados com HE (MOI 500). Células ainda preservam a monocamada e o contato intercelular (seta) (200x).

Figura 52 - Hepatócitos invadidos por *L. monocytogenes* 4b, após 3h de incubação, corados com HE (MOI 5000). Observa-se ruptura da monocamada celular e presença de bactérias intracelulares, conforme indicam as setas (400x).

Figura 53 - Hepatócitos invadidos por *Listeria monocytogenes* 1/2a, após 3h de incubação, corados com HE (MOI 500). Monocamada ainda apresenta contatos intercelulares preservados, conforme indica a seta (400x).

Figura 54 - Hepatócitos invadidos por *Listeria monocytogenes* 1/2a, após 4h de incubação, corados com HE (MOI 5000). A seta indica perda de contatos intercelulares (200x).

Figura 55 - Micrografia de hepatócitos controle. Presença de núcleo redondo com cromatina centralizada, mitocôndrias, vacúolos e retículo endoplasmático típicos, conforme setas (6000x).

Figura 56 - Micrografia de hepatócito invadido por *S. Typhimurium*, após 3h de incubação (MOI 500). Seta indica corte da bactéria no interior da célula (5000x).

Figura 57 - Micrografia de hepatócito invadido por *Salmonella* Typhimurium em processo de morte por apoptose, após 6h de incubação (MOI 5000) Os corpos apoptóticos começam a se destacar da célula (setas) (5000x).

Figura 58 - Micrografia de hepatócito invadido por *L. monocytogenes* 4b, após 1h de incubação (MOI 5000). Seta indica várias bactérias presentes no interior do hepatócito (12000x).

Figura 59 - Micrografia de hepatócito invadido por *L. monocytogenes* 4a, após 1h de incubação (MOI 5000). Seta indica várias bactérias presentes no interior do hepatócito (5000x).

Figura 60 - Micrografia de hepatócito em apoptose invadido por *Listeria monocytogenes* 4a, após 4h de incubação (MOI 50000). Podemos observar grande número de vacúolos contendo material celular, desorganização do citoplasma e formação de corpos apoptóticos, conforme indicação das setas (5000x).

Figura 61 - Micrografia de hepatócito em apoptose invadido por *Listeria monocytogenes* 4b, após 3h de incubação (MOI 5000). Podemos observar reorganização do material nuclear com cromatina de distribuição marginal no núcleo, e presença de corpos apoptóticos, conforme indicam as setas (5000x).

5. DISCUSSÃO

A cultura primária de hepatócitos utilizada em nossos experimentos foi testada anteriormente pelo nosso grupo quanto à viabilidade celular, e comprovação do hepatócito cultivado através da presença das citoqueratinas AE1 e AE3, da fração 5 das isoenzimas de DHL e da detecção de albumina no sobrenadante (ambos elementos específicos do hepatócito). Este conjunto garantiu a qualidade dos experimentos, que foram realizados em sua totalidade utilizando hepatócitos com viabilidade superior a 90%. Na cultura celular pudemos observar a presença de figuras de mitose, característica da célula hepática quando está bem adaptada ao cultivo, mantendo diferenciação funcional.

Os hepatócitos podem desempenhar um papel importante na iniciação, e amplificação da resposta inflamatória aguda no fígado, havendo ao menos duas vias principais pelas quais a rede de citocinas proinflamatórias pode ser ativada. Em uma das vias, a produção de citocinas pelos hepatócitos poderia ser estimulada por agonistas liberados pelas células de Kupffer. A outra via seria exercida pelas células endoteliais, capazes de também estimular os hepatócitos (Rowell, Eckmann, Kagnoff et al., 1997).

A utilização de hepatócitos, como células-alvo para invasão por *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* Typhimurium, é justificada pelo fato dessas bactérias se replicarem preferencialmente nessas células, em

comparação com as células de Kupffer (Rosen, et. al., 1989; Conlan e North, 1991; Havell e Sehgal, 1991, Gregory, et al., 1992).

Para traçarmos um perfil de cada cepa, avaliando seu comportamento dentro de condições ótimas de crescimento, estabelecemos a curva de crescimento para cada bactéria. Existem quatro diferentes etapas do crescimento bacteriano: lag, log, estacionária e de declínio. A fase *lag* é um período variável de preparação para o crescimento, onde ainda não há um aumento significativo da população bacteriana, e o número de organismos permanece praticamente inalterado. Essa fase ocorre porque as bactérias encontram-se ainda depletadas de várias coenzimas essenciais, e/ou outros constituintes celulares necessários à absorção dos nutrientes presentes no meio. Na fase *log* ou exponencial, as células estão plenamente adaptadas, absorvendo os nutrientes, sintetizando seus constituintes, crescendo e se multiplicando. Na fase estacionária os nutrientes ficam escassos e os produtos tóxicos se tornam abundantes. Nessa etapa não há um crescimento líquido da população bacteriana, ou seja, o número de bactérias que se divide é equivalente ao número que morre. A fase de declínio ocorre quando a maioria das bactérias está em processo de morte, embora outras ainda estejam se dividindo. A contagem total permanece relativamente constante, mas o número de bactérias viáveis cai lentamente. (Trabulsi, 1999)

Observamos o comportamento das cepas utilizadas nesse estudo, a saber, *Salmonella* Typhimurium, *Listeria monocytogenes* 4a, 4b e 1/2a, no decorrer de 24 horas de incubação. Analisando as curvas de crescimento,

observamos que *L. monocytogenes* 4b e 1/2a apresentaram comportamentos semelhantes, com fase lag de 7h, indicando que essas cepas necessitavam de um período considerável de adaptação às condições *in vitro*, para então iniciarem sua multiplicação. Quando isso aconteceu, entraram em fase de crescimento exponencial. As cepas atingiram absorbância máxima após 13h de incubação.

A cepa *L. monocytogenes* 4a mostrou comportamento semelhante à 4b e 1/2a, atingindo valores menores de absorbância, mas os mesmos tempos de fases lag e log.

Podemos notar também que a cepa de *Salmonella* Typhimurium apresentou fase lag menor, em torno de 4h, indicando que necessitou de um período menor de adaptação às condições *in vitro*, em relação às *Listerias*. Em seguida, entrou em fase de crescimento exponencial, atingindo absorbância máxima após 8h de incubação. Resultados semelhantes foram conseguidos por outros autores (Malheiros et al, 2007).

Por estes resultados podemos concluir, pelo nosso modelo de estudo, que as *Listerias* necessitaram de mais tempo para se adaptarem às condições ambientais, enquanto a *Salmonella* gastou a metade do tempo nessa fase. Essa característica tornaria a *Salmonella* provavelmente mais eficiente na abordagem ao hospedeiro. Quanto maior a fase lag de uma bactéria, maior a possibilidade do hospedeiro conseguir desenvolver uma resposta imune adequada.

Para verificarmos a capacidade invasiva de cada bactéria estudada, fizemos a contagem das bactérias intracelulares após cada tempo de

incubação. Notamos que houve maior recuperação de *S. Typhimurium* dos hepatócitos em comparação às demais bactérias. Recuperamos cerca de 10^5 vezes mais *S. Typhimurium* do que *L. monocytogenes* 4a, 10^4 vezes mais *S. Typhimurium* do que *L. monocytogenes* 4b, e 5×10^5 vezes mais *S. Typhimurium* do que *L. monocytogenes* 1/2a. Na comparação entre as cepas de *Listeria*, recuperamos cerca de 340 vezes mais *L. monocytogenes* 4b em comparação a *L. monocytogenes* 4a, e houve pouca diferença entre a recuperação de *L. monocytogenes* 4b e *L. monocytogenes* 1/2a. Já entre *L. monocytogenes* 4a e *L. monocytogenes* 1/2a houve grande diferença, sendo recuperadas dos hepatócitos até 300x mais *L. monocytogenes* 1/2a do que *L. monocytogenes* 4a.

Estes dados mostram que *S. Typhimurium* foi a bactéria que mais invadiu os hepatócitos em quantidade, seguida por *L. monocytogenes* 4b e LM 1/2a. Por outro lado, *L. monocytogenes* 4a foi a que menos invadiu as células. Esses resultados estão de acordo com aqueles encontrados na curva de crescimento de cada bactéria. Jaradat e Bhunia (2003) estudaram os 13 sorotipos de *L. monocytogenes* em relação à sua capacidade de adesão e invasão, e mostraram que as cepas 1/2a, 1/2b e 4b apresentavam alta capacidade de invasão em células epiteliais Caco-2, variando de 0,14% a 0,32%. Wood et al em 1993, já haviam observado a capacidade dessas bactérias invadirem e se multiplicarem em linhagens de hepatócitos murinos. Quanto à invasividade da *Salmonella* Typhimurium, Lajarin et al (1996) encontraram dados opostos aos nossos em seus experimentos com hepatócitos murinos. Estes autores mostraram que a invasividade da

Salmonella Typhimurium foi aproximadamente 100 vezes menor que a encontrada em *Listeria monocytogenes*. Estes resultados podem ser devidos à virulência das cepas de *Listeria* utilizadas em nossos experimentos em comparação com as cepas utilizadas por Lajarin et al.

Além de invadir os hepatócitos, as cepas de *Listeria* foram testadas também quanto à sua capacidade hemolítica. Como não encontramos resultados positivos, buscamos uma metodologia que potencializasse a propriedade hemolítica dessas bactérias, mesmo se a hemólise estivesse presente em baixa expressão. Para observar as atividades hemolítica e fosfolipídica das cepas de *L. monocytogenes in vitro*, utilizamos técnica de cultivo das bactérias em meio contendo lecitina e carvão ativado. Essa técnica baseia-se no conceito de que as fosfolipases C, PlcA e PlcB, presentes em *L. monocytogenes*, são potenciais marcadores de virulência que podem ser usados na diferenciação de *Listeria* spp patogênica e não patogênica (Ermolaeva et al, 2003). Dessas substâncias, a fosfolipase PlcB, ou lecitinase, é particularmente adequada, pois sua atividade pode ser facilmente visualizada em placas de ágar suplementadas com gema de ovo. O problema é que, *in vitro*, cepas selvagens de *L. monocytogenes* normalmente produzem baixos níveis de fatores associados à virulência, tornando difícil identificar esses fatores em placas de ágar. Dessa forma, a fosfolipase PlcB é normalmente expressa de forma muito fraca, e o teste da lecitinase para *L. monocytogenes* pode resultar negativo. Geoffroy et al. (1991) observaram que a adição de carvão ativado aumenta a expressão de proteínas, como as fosfolipases e a hemolisina. Ermolaeva et al. (2003)

sugeriram que o carvão ativado atua como quelante de uma substância repressora, produzida por cepas de *L. monocytogenes* na fase exponencial, que impediria a ativação de PrfA (gene regulador de virulência para expressão de internalina). Na presença de carvão ativado, todos os genes de virulência regulados por PrfA, incluindo aquele que codifica a lecitinase, produzem aumento dramático na atividade da enzima cognata. Dessa forma, a indução da atividade da lecitinase pelo carvão ativado é uma propriedade única e universal de cepas de *Listeria* do tipo selvagem. O desvio desse comportamento tem sido observado apenas em cepas que carregam mutações no gene *prfA*, que por sua vez codifica o gene ativador de virulência PrfA (Ermolaeva et al, 2003).

Portanto, os nossos resultados nessa etapa mostraram ausência de hemólise, atividade fosfolipídica, e do fator regulatório PrfA em todas as cepas de *Listeria* testadas, tanto no cultivo em ágar sangue, quanto em ágar BHI enriquecido de lecitina, e também em ágar BHI com lecitina suplementado com carvão ativado.

A presença ou ausência de atividade hemolítica apresenta relação duvidosa com a virulência de *L. monocytogenes*. Chui et al. (2006) caracterizaram cepas de *L. monocytogenes* pertencentes a diferentes sorotipos e origens, quanto ao seu potencial patogênico, utilizando a atividade hemolítica e fosfolipídica como uma das ferramentas de estudo. Dentre as cepas avaliadas destacou-se “Scott A”, cepa reconhecidamente patogênica e pertencente ao sorotipo 4b, que apresentou hemólise fraca, assim como baixa atividade da fosfolipase. Tanto as cepas de *L.*

monocytogenes hemolíticas, quanto as não-hemolíticas, exibem habilidades semelhantes para invadir os hepatócitos, mas apenas as hemolíticas são capazes de se multiplicar de forma significativa dentro dessa linhagem celular (Wood et al., 1993). Os nossos resultados foram de encontro a essas observações, pois conseguimos recuperar quantidades pequenas das bactérias do meio intracelular.

Segundo Kim e Wei (2007) que fizeram uma comparação da invasividade entre cepas de *Salmonella* e outras bactérias, inclusive *L. monocytogenes*, as *Listerias* teriam maior poder invasivo. Entretanto, nesse mesmo trabalho, os autores citam outros artigos com dados contrários aos seus. Apesar das *Listerias* não hemolíticas conseguirem invadir os hepatócitos desde a primeira hora de incubação, parece que não são capazes de se multiplicar além da fase do vacúolo de dupla membrana (Santos et al, 2005). Assim, é provável que as cepas de *L. monocytogenes* utilizadas em nossos experimentos não produzam listeriolisina O (LLO), e por isso tenham dificuldades na etapa de invasão célula-a-célula, quando se forma o vacúolo de dupla membrana. A LLO é fundamental para a fuga da bactéria desse tipo de vacúolo, formado pela célula hospedeira (Gedde, et al., 2000). As bactérias hemolíticas rapidamente escapam desse vacúolo, multiplicando-se no citosol da célula hospedeira, enquanto as bactérias não-hemolíticas permanecem presas ao vacúolo, e crescem menos no meio intracelular. Portanto, nós podemos especular que as cepas de *L. monocytogenes* utilizadas em nossos experimentos foram capazes de internalizar-se, mas tiveram dificuldades na disseminação célula-a-célula.

Vazquez-Boland et al. (2001a) afirmaram que *L. monocytogenes* teria um potencial patogênico menor que outros patógenos de origem alimentar, pois apresentam valores relativamente altos de DL50 (dose letal de 50%) em camundongos infectados experimentalmente. *L. monocytogenes* detectada em alimentos responsáveis por epidemias, bem como em casos esporádicos de listeriose, usualmente é encontrada em grande número (cerca de 10^6), sugerindo que seja necessária dose mínima alta dessa bactéria para causar infecção clínica. No entanto, esses dados devem ser interpretados com cautela, dado o longo período de incubação da listeriose invasiva, e o tempo normalmente perdido entre o diagnóstico e a análise do alimento ingerido, durante o qual a bactéria pode se multiplicar no alimento estocado. É possível que baixas doses da bactéria sejam capazes de causar infecção, principalmente em pessoas imunossuprimidas, idosos e mulheres grávidas. A dose infecciosa de *Listeria* sempre pode variar dependendo da patogenicidade e virulência da cepa de *L. monocytogenes* envolvida, e os fatores de risco do hospedeiro.

Nós realizamos a comparação estatística entre a liberação de TNF-alfa de hepatócitos controle (controle negativo), e hepatócitos estimulados com estaurosporina (controle positivo). A estaurosporina induz apoptose em vários tipos celulares e é amplamente utilizada como indutor de estresse celular (Feng e Kaplowitz, 2002). Verificamos que tanto a taxa de liberação de TNF-alfa (inclinação da reta) quanto a capacidade de produção dessa citocina (interseção com o eixo Y) foram significativamente diferentes para os dois grupos controle.

A taxa de liberação de TNF-alfa por hepatócitos invadidos por *S. Typhimurium* foi maior na concentração 5×10^{10} , e a capacidade máxima de produção de TNF-alfa para *S. Typhimurium* foi observada na concentração 5×10^8 . Para *L. monocytogenes* 4a, *L. monocytogenes* 4b, e *L. monocytogenes* 1/2a a taxa de liberação de TNF-alfa também foi maior na concentração 5×10^{10} , porém as capacidades máximas de produção de TNF-alfa ocorreram em concentrações diferentes das 3 cepas: 5×10^9 para LM 4a, 5×10^{10} para LM 4b e 5×10^5 para LM 1/2a.

A comparação estatística da taxa de liberação de TNF-alfa entre hepatócitos invadidos por *S. Typhimurium*, hepatócitos estimulados com estaurosporina, e hepatócitos controle, indicou que na concentração de *S. Typhimurium* 5×10^8 , houve maior taxa de liberação de TNF-alfa. A mesma comparação para *L. monocytogenes* 4a mostrou significância em todas as concentrações pesquisadas em relação ao controle, com maior taxa de liberação de TNF-alfa na concentração 5×10^9 . Para *L. monocytogenes* 4b houve significância nas concentrações 5×10^5 e 5×10^{10} , e maior taxa de liberação de TNF-alfa com 5×10^{10} . A única cepa de *Listeria*, que não mostrou diferença estatística na taxa de liberação de TNF-alfa em relação ao grupo controle, foi *L. monocytogenes* 1/2a.

Quando fixamos a concentração bacteriana em 5×10^{10} e comparamos as quatro bactérias entre si, verificamos que haviam diferenças significativas na taxa de liberação de TNF-alfa entre *S. Typhimurium*, *L. monocytogenes* 4a, 4b e 1/2a. Na análise comparativa, *S. Typhimurium* produziu a maior taxa de liberação de TNF-alfa pelos hepatócitos invadidos. *L.*

monocytogenes 4a e 4b, por sua vez, produziram taxas de liberação da citocina em faixa intermediária, enquanto *L. monocytogenes* 1/2a foi a cepa responsável pela menor liberação de TNF-alfa.

Na análise da capacidade de produção de TNF-alfa por hepatócitos invadidos por *S. Typhimurium* obtivemos diferenças significativas entre o grupo controle e *S. Typhimurium* nas concentrações 5×10^7 a 5×10^9 . Entretanto, a capacidade máxima de produção da citocina pelos hepatócitos ocorreu na concentração de ST 5×10^8 . Para *L. monocytogenes* 4a houve diferenças significativas em relação ao controle, nas concentrações 5×10^5 , 5×10^9 e 5×10^{10} . Entre essas concentrações, a capacidade máxima de produção de TNF-alfa ocorreu com 5×10^9 . A mesma análise para *L. monocytogenes* 4b mostrou diferenças significativas entre o grupo controle e as concentrações 5×10^5 e 5×10^{10} da bactéria, sendo essa última a concentração em que a capacidade máxima de produção de TNF-alfa pelos hepatócitos invadidos foi verificada. Para a bactéria *L. monocytogenes* 1/2a, não foi possível distinguir uma concentração em que houvesse uma capacidade máxima de produção de TNF-alfa.

Quando fixamos a concentração bacteriana em 5×10^{10} obtivemos diferenças significativas quanto à capacidade de produção de TNF-alfa entre o grupo LM 4b comparado aos grupos controle, estaurosporina, *L. monocytogenes* 4a e *L. monocytogenes* 1/2a. Não houve significância entre LM 4b e *S. Typhimurium*. Portanto, a cepa *L. monocytogenes* 4b apresentou a maior capacidade de produção de TNF-alfa pelos hepatócitos, seguida por

S. Typhimurium, *L. monocytogenes* 4a e *L. monocytogenes* 1/2a. Essa última induziu a menor capacidade de produção de TNF-alfa.

Em resumo, *S. Typhimurium* foi responsável pela taxa de liberação mais rápida de TNF-alfa pelos hepatócitos, enquanto *L. monocytogenes* 4b foi a responsável pela maior capacidade de produção dessa citocina. Podemos relacionar estes dados com aqueles encontrados quando traçamos a curva de crescimento de cada bactéria. Como vimos, *S. Typhimurium* foi capaz de se adaptar mais rapidamente ao meio ambiente e multiplicar-se mais rápido. Este foi provavelmente um dos motivos que levou essa bactéria a estimular a liberação de TNF-alfa em progressão rápida. Quanto à capacidade de induzir a produção de TNF-alfa, *S. Typhimurium* também se comportou de forma eficiente, sendo superada apenas por *L. monocytogenes* 4b. Segundo Kim e Wei (2007) a habilidade da *Salmonella* sobreviver e replicar em células hospedeiras é essencial para sua virulência. Ao lado do sistema de secreção do tipo III, as *Salmonellas* possuem um segundo sistema do tipo III, codificado na ilha de patogenicidade (SPI-2), para injetar proteínas efetoras no citosol, bloqueando a fusão do fagossomo com o lisossomo, e interferindo com o tráfico celular normal.

Os nossos resultados, mostrando que LM 4b apresentou grande capacidade de produção de TNF-alfa pelos hepatócitos invadidos, são interessantes por apresentar possível correlação com fatos clínicos conhecidos dessa bactéria. Dentre os sorotipos associados à listeriose, as cepas 4b causam mais de 50% dos casos de listeriose no mundo, embora as cepas do grupo antigênico 1/2 (1/2a, 1/2b, e 1/2c) predominem em

alimentos isolados. Este fato sugere que as cepas do sorotipo 4b são mais adaptadas aos tecidos dos hospedeiros que as cepas de sorotipo 1/2a. Um grupo de cepas isoladas do sorotipo 4b, fenotipicamente e genotipicamente próximos, foi responsabilizado pelas principais epidemias de listeriose humana de origem alimentar no mundo, como as que ocorreram na Califórnia em 1985, na Suíça de 1983 a 1987, na Dinamarca de 1985 a 1987, e na França em 1992, apoiando a teoria de que alguns clones de *L. monocytogenes* podem ser particularmente patogênicos. Apenas três de 12 sorotipos conhecidos de *L. monocytogenes*, 1/2a, 1/2b, e 4b, somam mais de 90% dos casos de listeriose humana e animal, embora outros sorotipos, como 1/2c, sejam freqüentemente encontrados como contaminantes de alimentos (Vazquez-Boland et al 2001a).

Sashinami et al (2006) afirmaram que o TNF-alfa é produzido continuamente durante uma infecção persistente, e também na fase aguda da infecção por *Salmonella*. Isto permitiria a manutenção do crescimento atenuado da bactéria no hospedeiro. É possível que este seja um dos motivos pelo qual uma célula de origem epitelial, como o hepatócito, tenha a capacidade de produzir TNF-alfa quando invadido por bactérias. Outro motivo plausível seria a indução da sua própria morte por apoptose, talvez para facilitar o combate à infecção pela imunidade do hospedeiro.

Na análise da taxa de apoptose estimada pelo método TUNEL, observamos que *S. Typhimurium* e *L. monocytogenes* 1/2a produziram as maiores taxas de apoptose dos hepatócitos entre as bactérias pesquisadas, sendo ambas semelhantes entre si ($P > 0,05$). A taxa de apoptose de *L.*

monocytogenes 4b mostrou padrão intermediário, enquanto *L. monocytogenes* 4a induziu as menores taxas de apoptose dos hepatócitos.

Foi realizada, também, a comparação dos resultados da capacidade de produção de apoptose entre hepatócitos invadidos por *S. Typhimurium* e *L. monocytogenes* 4a, 4b e 1/2a. Pudemos notar que a capacidade máxima de produção de apoptose dos hepatócitos invadidos ocorreu com *S. Typhimurium* e LM 1/2a, não havendo diferença significativa entre os dois grupos ($P > 0,05$). Valores decrescentes foram encontrados com LM 4b e LM 4a.

Quando avaliamos os resultados da taxa de apoptose pela técnica da anexina, notamos algumas diferenças nos resultados em relação ao método TUNEL. Nessa análise, *L. monocytogenes* 4b produziu a maior taxa de apoptose seguida por *L. monocytogenes* 4a, *L. monocytogenes* 1/2a e *S. Typhimurium*. Os resultados com anexina mostraram que *S. Typhimurium* e *L. monocytogenes* 1/2a, ao contrário dos resultados obtidos pelo método TUNEL, produziram as menores taxas de apoptose dos hepatócitos. Não houve diferença estatística entre *S. Typhimurium* e *L. monocytogenes* 1/2a ($P > 0,05$)

Uma possível explicação para estes resultados diferentes, remete às características das duas técnicas utilizadas para mensurar a morte celular neste trabalho. Pela técnica da anexina procura-se avaliar a apoptose em fase precoce, quando a fosfatidilserina migra da face interna para a face externa da membrana plasmática, enquanto pela técnica TUNEL avalia-se a apoptose em fase mais avançada, quando a célula apresenta clivagens em

sua cromatina, características desse tipo de morte celular. Podemos especular que *L. monocytogenes* 1/2a e *S. Typhimurium* (maiores taxas de apoptose pelo TUNEL), induzem uma sinalização celular mais prolongada para produzir apoptose do que *L. monocytogenes* 4b e 4a (maiores taxas de apoptose com anexina).

Também quanto à análise da capacidade de produção de apoptose, os resultados foram diferentes com anexina. Por essa técnica *L. monocytogenes* 4a e 4b mostraram maior capacidade na produção de apoptose. Em ordem decrescente detectamos capacidade de produzir apoptose para *L. monocytogenes* 1/2a e *S. Typhimurium*. Não houve diferença estatística entre *L. monocytogenes* 4a e *L. monocytogenes* 1/2a ($P > 0,05$).

O método da anexina também permitiu a análise comparativa dos dados sobre necrose. Podemos observar que *L. monocytogenes* 4b e 4a produziram as maiores taxas de necrose em relação a todas as cepas utilizadas, sem diferença estatística entre elas ($P > 0,05$). Em ordem decrescente tivemos taxas de indução de necrose com *S. Typhimurium* e *L. monocytogenes* 1/2a.

Quando foi comparada a capacidade de produzir necrose, notamos que *L. monocytogenes* 4a mostrou a maior capacidade em produzir necrose dos hepatócitos, em relação às demais cepas. A capacidade para produzir necrose foi obtida em ordem decrescente para *L. monocytogenes* 1/2a, *S. Typhimurium* e *L. monocytogenes* 4b. Não houve diferença estatística entre *L. monocytogenes* 1/2a e *S. Typhimurium*.

A técnica da anexina para detecção de morte celular permite também avaliar a chamada apoptose tardia, conhecida também como necrose secundária ou necrose apoptótica, que ocorreria quando as células em apoptose perdem energia entrando em necrose (Kosmider et al, 2004). Podemos observar que *L. monocytogenes* 4b e *L. monocytogenes* 4a produziram apoptose tardia em taxas maiores que *L. monocytogenes* 1/2a e *S. Typhimurium*. Não houve diferença estatística entre *L. monocytogenes* 4b e 4a e entre *L. monocytogenes* 1/2a e *S. Typhimurium* ($P > 0.05$). A análise da capacidade de produção de apoptose tardia mostrou que *L. monocytogenes* 4b e 4a foram as bactérias que tiveram a maior capacidade de produzir este tipo de morte celular em hepatócitos invadidos, sem diferença estatística entre elas ($P > 0,05$). Em ordem decrescente tivemos: *L. monocytogenes* 1/2a e *S. Typhimurium*, que também não apresentaram diferença estatística entre elas.

Os nossos resultados mostraram que *L. monocytogenes* 4a se destacou nas taxas e capacidades de produzir apoptose tardia e necrose. Segundo Liu et al (2007) o sorotipo 4a raramente é responsável por infecções em seres humanos. Essas cepas naturalmente avirulentas contêm o gene regulador de virulência PrfA intacto, exceto aquelas que apresentam algum defeito no gene actA. Também *L. monocytogenes* 4a possui uma cópia completa do gene da internalina A, e algumas vezes possui uma cópia alterada da internalina B. Os testes realizados com a nossa cepa *L. monocytogenes* 4a mostraram que ela provavelmente não tem o gene PrfA ativo, o que poderia explicar a sua menor virulência *in vitro*, tornando o

processo apoptótico mais demorado. Este fenômeno poderia levar a déficit celular energético, e conseqüentemente à morte por necrose. Como essa cepa é capaz de se replicar até o momento em que encontra o impedimento do vacúolo de dupla membrana (por não sintetizar listeriolisina O), é possível que ela induza a morte apoptótica mais lentamente também em razão de sua incapacidade de se disseminar célula a célula. As taxas obtidas de necrose e apoptose tardia sugerem que provavelmente os sinais de morte já haviam sido acionados pela bactéria, antes do seu aprisionamento no vacúolo de dupla membrana.

Segundo Beyaert e Fiers (1994), o TNF-alfa pode induzir morte celular necrótica ou apoptótica. Assim, esta citocina pode induzir apoptose e necrose nos hepatócitos invadidos por *S. Typhimurium*. Apesar disso, essa bactéria foi incapaz de induzir apoptose precoce, não tendo sido detectada pela técnica da anexina. Como *S. Typhimurium* produziu altas taxas de liberação, bem como capacidade de produção dessa citocina, é possível que o processo de morte desencadeado pela ação do TNF-alfa seja mais tardio, em relação a outros estimulantes da morte celular, entre os quais a própria bactéria (Cousens & Wing, 2000). *L. monocytogenes* 4a induziu os hepatócitos a taxas e capacidades de produção de TNF-alfa relativamente baixas, assim foi incapaz de induzir apoptose por clivagens na cromatina (detectada pela técnica TUNEL). Por outro lado, foi capaz de induzir necrose e apoptose tardia (técnica da anexina), possivelmente também induzidas por TNF-alfa. *L. monocytogenes* 4b induziu a produção de TNF-alfa pelos

hepatócitos, a morte apoptótica (TUNEL e anexina), a necrose e a apoptose tardia. Assim, esta bactéria provavelmente desencadeia uma rápida sinalização capaz de induzir apoptose precoce, clivagem da cromatina e necrose. Por estas características, *L. monocytogenes* 4b parece ser a bactéria mais eficaz (dentre as estudadas) no processo de invasão celular. *L. monocytogenes* 1/2a não foi capaz de produzir TNF-alfa em proporções estatisticamente significativas, mas induziu apoptose por TUNEL. Isto pode indicar que neste caso, o TNF-alfa não foi um dos responsáveis pela morte celular apoptótica, que ocorreu por outras vias de sinalização. Essa bactéria também não foi capaz de sinalizar apoptose precoce e necrose.

Segundo Gao e Kwaik (2000), a apoptose pode desempenhar um papel importante na patologia das infecções. A apoptose induzida por *Salmonella* poderia contribuir para a fuga das bactérias intracelulares das células hospedeiras, já privadas de nutrientes, e em fase estacionária de crescimento. A modulação das vias apoptóticas do hospedeiro poderia interferir na regulação da resposta imune do hospedeiro, resultando em dispersão sistêmica do organismo, como ocorre na salmonelose. Como já referido anteriormente, com *Listeria monocytogenes* que expressa listeriolisina O (LLO) ocorre lise da membrana fagossômica, e conseqüente fuga para o citosol com início da infecção intracelular. *L. monocytogenes* induz apoptose mediada por LLO numa variedade de tipos celulares incluindo hepatócitos, linfócitos e células dendríticas (Gao e Kwaik, 2000). Provavelmente a LLO cause a liberação do citocromo c pelas mitocôndrias, ativando a cascata das caspases. As caspases também poderiam ser

ativadas por efluxo de cálcio das mitocôndrias. Em contraste com outros patógenos intracelulares que induzem apoptose, *L. monocytogenes* não induz apoptose em macrófagos, embora estes percam sua viabilidade como resultado da necrose mediada por LLO. A indução de apoptose em células epiteliais poderia ser uma característica da resposta do hospedeiro à invasão bacteriana. A apoptose em células epiteliais é mais atrasada em comparação com os macrófagos, e requer a invasão da bactéria e a sua replicação intracelular. Podemos especular que a apoptose das células epiteliais em resposta à invasão bacteriana, teria a finalidade de ajudar a eliminar as células epiteliais infectadas e/ou danificadas, restaurando a integridade dos tecidos epiteliais.

A análise morfológica realizada contribuiu com mais elementos para a comparação da virulência entre as bactérias estudadas. Notamos que *S. Typhimurium* foi capaz de induzir alterações morfológicas significativas (ruptura da monocamada) em concentração menor (MOI 500) em relação às *Listerias*. Por outro lado, *L. monocytogenes* sorogrupos 4b, 4a e 1/2a invadiram as células em menor tempo em relação à *S. Typhimurium* (1h de incubação), porém demoraram pelo menos 3 horas para induzir alterações morfológicas significativas. Podemos supor que as *Listerias* conseguem invadir os hepatócitos com maior rapidez em relação a *S. Typhimurium*, porém essa característica não parece representar um fator agressivo maior para as células invadidas.

É conhecido que a aparência morfológica da célula apoptótica tem duração curta, limitada a apenas alguns minutos (Russel et al., 1972;

Sanderson, 1976; Kerr et al., 1987), e os corpos apoptóticos em formas diversas são vistos por apenas algumas horas antes de serem fagocitados (Wyllie et al., 1980; Brusch et al.; 1990). Apesar disso, conseguimos documentar a morte por apoptose na microscopia eletrônica tanto para *S. Typhimurium* quanto para *L. monocytogenes*.

Os resultados do nosso estudo visam contribuir para o conhecimento da relação entre duas bactérias invasivas importantes, *Salmonella Typhimurium* e *Listeria monocytogenes*, com as células do hospedeiro, aqui representadas pelos hepatócitos. Este conhecimento representa um primeiro passo para futuras estratégias de tratamento que permitam controlar as infecções por bactérias invasivas, usando como ferramentas o controle da produção de citocinas como o TNF-alfa, bem como da morte celular por apoptose e necrose.

6. CONCLUSÕES

- As monocamadas de hepatócitos agredidas por *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* Typhimurium apresentam ruptura em sua distribuição, e sinais de desorganização citoplasmática e nuclear.
- Ocorre liberação de TNF-alfa pelos hepatócitos invadidos por bactérias, sendo que a *Salmonella* Typhimurium foi responsável pela maior taxa de liberação de TNF-alfa, e *Listeria monocytogenes* 4b pela maior capacidade de produção de TNF-alfa.
- Ocorre morte por apoptose nos hepatócitos invadidos por bactérias, avaliada através da técnica TUNEL, sendo que *Salmonella* Typhimurium e *Listeria monocytogenes* 1/2a foram responsáveis pelas maiores taxas e capacidades de produção de apoptose.
- Ocorre morte dos hepatócitos invadidos por apoptose, avaliada através da técnica da anexina, sendo que *Listeria monocytogenes* 4b e 4a foram responsáveis pelas maiores taxas de apoptose,

enquanto *Listeria monocytogenes* 1/2a e 4a foram responsáveis pelas maiores capacidades de produção de apoptose.

- Concluimos que *Listeria monocytogenes* 4b foi a cepa que apresentou maior virulência, dentre todas estudadas neste trabalho, tendo produzido uma das maiores taxas e capacidades de produção de TNF e apoptose.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alonso A, Portillo FG-del. Hijacking of eukaryotic functions by intracellular bacterial pathogens. *Int. Microbiol.* 2004; 7: 181-91.

Andrade Júnior D.R. *Estudo de hepatócitos de rato em cultura primária submetidos a hipóxia e reoxigenação: Ação dos citoprotetores prostaglandina E1, superóxido dismutase, verapamil, alopurinol, clorpromazina, e efeito citotóxico da actinomicina D* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 1996.

Andree HA, Reutelingsperger CP, Hauptmann R, Hemker HC, Hermens WT, Willems GM. Binding of vascular anticoagulant alpha (VAC alpha) to planar phospholipid bilayers. *J Biol Chem.* 1990; 265: 4923–8.

Baker SJ, Reddy EP. Transducers of life and death: TNF receptor superfamily and associated proteins. *Oncogene.* 1996; 12: 1–9.

Barsig J, Kaufmann SH. The mechanism of cell death in *Listeria monocytogenes*-infected murine macrophages is distinct from apoptosis. *Infect. Immun.* 1997; 65: 4075-81.

Bazzoni F, Beutler B. The tumor necrosis factor ligand and receptor families. *N. Engl. J. Med.* 1996; 334: 1717–25.

Beyaert R, Fiers W. Molecular mechanisms of tumor necrosis factor-induced cytotoxicity. What we do understand and what we do not. *FEBS Lett.* 1994; 340: 9–16.

Bielecki J, Youngman P, Connelly P, Portnoy DA. *Bacillus subtilis* expressing a hemolysin gene from *Listeria monocytogenes* can grow in mammalian cells. *Nature.* 1990; 345: 175–6.

Bierne H, Mazmanian SK, Trost M, Pucciarelli MG, Liu G, Dehoux P., Jänsch L, Portillo FG, Schneewind O, Cossart P. Inactivation of the *srtA* gene in *Listeria monocytogenes* inhibits anchoring of surface proteins and affects virulence. *Mol Microbiol.* 2002; 43: 869–81.

Bohn H. Placental and pregnancy proteins. In: F.G. Lehmann, Editor. *Carcino embryonic proteins*. Amsterdam: Elsevier; 1979. v. 1, p. 289–99.

Breed RS, Murray EGD, Hitchens AP. *Bergey's manual of determinative bacteriology*. Baltimore: The William and Wilkins Co. 1948.

Brenner FW, Villar RG, Ângulo FJ, Tauxe R, Swaminathan B. *Salmonella* Nomenclature. *J. ClinMicrobiol.* 2000; 38: 2465-7.

Bretscher MS. Asymmetrical lipid bilayer structure for biological membranes.

Nature New Biol. v. 1972; 236: 11–2.

Brunet C, Gunby RH, Benson RS, Hickman JA, Watson AJ, Brady G.

Commitment to cell death measured by loss of clonogenicity is separable from the appearance of apoptotic markers. *Cell. Death Different.* 1998; 5: 107–15.

Brusch W, Kleine L, Tenniswood M. The biochemistry of cell death by apoptosis. *Biochem Cell Biol.* 1990; 88: 1071-4.

Buncic S, Avery SM, Rocour J, Dimitrijevic M. Can foodrelated environmental factors induce different behaviour in two key serovars, 4b and ½ a, of *Listeria monocytogenes*? *Int. J. Food Microbiol.* 2001; 65: 201–12.

Buttke TM, Sandstrom PA. Oxidative stress as a mediator of apoptosis. *Immunol. Today.* 1994; 15: 7-10.

Chancerelle Y, Mathieu J, Kergonou JF. Recognition and elimination of senescent erythrocytes: Implication of antibodies specific for malonicdialdehyde-protein adducts, as demonstrated by flow cytometry. *Biochem Mol Biol Int.* 1994; 34: 1259–70.

Chaturongakul S, Raengpradub S, Wiedmann M, Boor KJ. Modulation of stress and virulence in *Listeria monocytogenes*. *Trends in Microbiol.* 2008; 16: 388-96.

Collazo CM, Galan JE. The invasion-associated type-III protein secretion system in *Salmonella*—a review. *Gene.* 1997; 192: 51–9.

Comfurius P, Senden JM, Tilly RH, Schroit AJ, Bevers EM, Zwaal RF. Loss of membrane phospholipid asymmetry in platelets and red cells may be associated with calcium-induced shedding of plasma membrane and inhibition of aminophospholipid translocase. *Biochim. Biophys. Acta.* 1990; 1026: 153–160.

Conlan JW, North RJ. Neutrophil-mediated dissolution of infected host cells as a defense strategy against a facultative intracellular bacterium. *J. Exp. Med.* 1991; 174: 741-4.

Connor J, Pak CH, Zwaal RF, Schroit AJ. Bidirectional transbilayer movement of phospholipid analogs in human red blood cells. Evidence for an ATP-dependent and protein-mediated process. *J Biol Chem.* 1992; 267: 19412–7.

Connor J, Pak CC, Schroit AJ. Exposure of phosphatidylserine in the outer leaflet of human red blood cells. Relationship to cell density, cell age, and clearance by mononuclear cells. *J Biol Chem.* 1994; 269: 2399–404.

Cossart P. Actin-based motility of pathogens: the Arp2/3 complex is a central player. *Cell. Microbiol.* 2000; 2: 195-205.

Cossart P, Bierne H. The use of host cell machinery in the pathogenesis of *Listeria monocytogenes*. *Curr. Opin. Immunol.* 2001; 13: 96–103.

Cossart P, Sansonetti PJ. Bacterial invasion: the paradigms of enteroinvasive pathogens. *Science.* 2004; 304: 242–8.

Cousens LP, Wing EJ. Innate defenses in the liver during *Listeria* infection. *Immunol Rev.* 2000; 174: 150-9.

Darwin KH, Miller VL. Molecular basis of the interaction of *Salmonella* with the intestinal mucosa. *Clin. Microbiol. Rev.* 1999; 12: 405–28.

Darzynkiewicz Z, Huang X, Okafuji M, King MA. Cytometric Methods to Detect Apoptosis. *Methods in Cell Biology.* 2004; 75: 307-41.

Devaux PF. Static and dynamic lipid asymmetry in cell membranes. *Biochemistry.* 1991; 30: 1163–73.

Diaz C, Schroit AJ. Role of translocases in the generation of phosphatidylserine asymmetry. *J Membr Biol.* 1996; 151: 1–9.

Eckmann L, Kagnoff MF, Fierer J. Epithelial cells secrete the chemokine interleukin-8 in response to bacterial entry. *Infect. Immun.* 1993; 61: 4569-74.

Engeland M, Nieland LJW, Ramaekers FCS, Schutte B, Reutelingsperger CPM. Annexin V-Affinity Assay: A Review on an Apoptosis Detection System Based on Phosphatidylserine Exposure. *Cytometry.* 1998; 31: 1–9.

Ermolaeva S, Karpova T, Novella S, Wagnera M, Scortii M, Tartakovski I, Vázquez-Boland JA. A simple method for the differentiation of *Listeria monocytogenes* based on induction of lecithinase activity by charcoal. *Int J Food Microbiol.* 2003; 82: 87– 94.

Fadok VA, Laszlo DJ, Noble PW, Weinstein L, Riches DW, Henson PM: Particle digestibility is required for induction of the phosphatidylserine recognition mechanism used by murine macrophages to phagocytose apoptotic cells. *J Immunol.* 1993; 151: 4274–85.

Fadok VA, Voelker DR, Campbell PA, Cohen JJ, Bratton DL, Henson PM: Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes

triggers specific recognition and removal by macrophages. *J Immunol.* 1992; 148: 2207–16.

Farber, J.M., Losos, J.Z. *Listeria monocytogenes*: a foodborne pathogen. CMAJ. 1988; 138: 413–418

Farber JM, Speirs JI. Potential use of continuous cell lines to distinguish between pathogenic and nonpathogenic *Listeria* spp. *J. Clin.Microbiol.* 1987; 25: 1463-6.

Feng G, Kaplowitz N. Mechanism of staurosporine-induced apoptosis in murine hepatocytes. *Am J Physiol. Gastrointest Liver Physiol.* 2002; 282: 825-34.

Fiers W. Tumor necrosis factor. Characterization at the molecular, cellular and in vivo level. *FEBS. Lett.* 1991; 285: 199–212.

Forsberg M, Blomgran R, Lerm M, Särndahl E, Sebt SM, Hamilton A, Stendahl O, Zheng L. Differential effects of invasion by and phagocytosis of *Salmonella* Typhimurium on apoptosis in human macrophages: potential role of Rho-GTPases and Akt. *J Leukoc Biol.* 2003;74: 620-9.

Franke WW, Denk H, Kalt R, Shmid E. Biochemical and immunological identification of cytokeratin proteins present in hepatocytes of mammalian liver tissue. *Exp. Cell. Res.* 1981; 131: 299-318.

Gaillard JL, Berche P, Mounier J, Richard S, Sansonetti PJ. *In vitro* model of penetration and intracellular growth of *L. monocytogenes* in the human enterocyte-like cell line Caco-2. *Infect. Immun.* 1987; 55: 2822–9.

Gaillard JL, Berche P, Sansonetti P. Transposon mutagenesis as a tool to study the role of hemolysin in the virulence of *Listeria monocytogenes*. *Infect. Immun.* 1986; 52: 50–5.

Gao LY, Kwaik A. The modulation of host cell apoptosis by intracellular bacterial pathogens. *Trends in microbial.* 2000; 306: 306-313.

Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J. Cell. Biol.* 1992; 119: 493-501.

Gedde MM, Higgins DE, Tilney LG, Portnoy DA. Role of listeriolysin O in cell-to-cell spread of *Listeria monocytogenes*. *Infect. Immun.* 2000; 68: 999-1003.

Geoffroy C, Raveneau J, Beretti JL, Lecroisey A, Vazquez-Boland JA, Alouf JE, Berche P. Purification and characterization of an extracellular 29-

kilodalton phospholipase C from *Listeria monocytogenes*. *Infect Immun*. 1991; 59: 2382-8.

Ghadially FN. *Ultrastructural pathology of the cell and matrix*. London: Butterworths ed. 1982.

Gianella RA, Washington O, Gemski P, Formal SB. Invasion of HeLa cells by *Salmonella* Typhimurium: a model for study of invasiveness of *Salmonella*. *J. Infect. Dis.* 1973; 128: 69-75.

Gorski L, Flaherty D, Mandrell RE. Competitive Fitness of *Listeria monocytogenes* serotype 1/2 a and 4b strains in mixed cultures with and without food in the U.S. Food and Drug Administration Enrichment Protocol. *Appl Environ Microbiol.* 2006; 72: 776–83.

Gregory SH, Barczynski LK, Wing EJ. Effector function of hepatocytes and kupffer cells in the resolution of systemic bacterial infections. *J. Leukoc. Biol.* 1992; 51: 421-4.

Grell M, Zimmermann G, Gottfried E, Chen CM, Grunwald U, Huang DC, Wu Lee YH, Durkop H, Engelmann H, Scheurich P, Wajant H, Strasser A. Induction of cell death by tumour necrosis factor (TNF) receptor 2, CD40 and CD30: a role for TNF-R1 activation by endogenous membrane-anchored TNF. *Embo J.* 1999; 18: 3034–43.

Guzman C, Domann E, Rohde M, Bruder D, Darji A, Weiss S, Wehland J, Chakraborty T, Timmis K. Apoptosis of mouse dendritic cells is triggered by listeriolysin, the major virulence determinant of *Listeria monocytogenes*. *Mol. Microbiol.* 1996; 20: 119–26.

Hayes MJ, Rescher U, Gerke V, Moss SE. Annexin–Actin Interactions. *Traffic.* 2004; 5: 571-6.

Hamon M, Bierne H, Cossart P. *Listeria monocytogenes*: a multifaceted model. *Nat Rev Microbiol.* 2006; 4: 423–34.

Havell EA, Sehgal PB. Tumor necrosis factor-independent IL-6 production during murine listeriosis. *J. Immunol.* 1991; 146: 756-61.

Higgins CF. Flip-flop: The transmembrane translocation of lipids. *Cell.* 1994; 79: 393–5.

Homburg CH, de Haas M, von dem Borne AE, Verhoeven AJ, Reutelingsperger CP, Roos D. Human neutrophils lose their surface Fc gamma RIII and acquire annexin V binding sites during apoptosis *in vitro*. *Blood.* 1995; 85: 532–40.

Horvitz HR. Genetic control of programmed cell death in the nematode *Caenorhabditiselegans*. *Cancer Res.* 1999; 59: 1701s-6s.

Horvitz HR. Worms, life, and death (Nobel lecture). *Chembiochem.* 2003; 4: 697–711.

Huang Y, Park YC, Rich RL, Segal D, Myszka DG, Wu H. Structural basis of caspase inhibition by XIAP: Differential roles of the linker versus the BIR domain. *Cell.* 2001; 104: 781–90.

Inaba N, Sato N, Ijichi M, Fukazawa I, Nito A, Takamizawa H, Luben G, Bohn H: The immunocytochemical location of two membraneassociated placental tissue proteins in human and cynomolgus monkey placentae. *Tumour Biol.* 1984; 5: 75–85.

Ireton K. Entry of the bacterial pathogen *Listeria monocytogenes* into mammalian cells. *Cell Microbiol.* 2007; 9: 1365-75.

Iwasaki A, Suda M, Nakao H, Nagoya T, Saino Y, Arai K, Mizoguchi T, Sato F, Yoshizaki H, Hirata M, Miyata T, Shidara Y, Murata M, Maki M: Structure and expression of cDNA for an inhibitor of blood coagulation isolated from human placenta: A new lipocortin-like protein. *J Biochem Tokyo.* 1987; 102: 1261–73.

Jaradat ZW, Bhunia AK. Adhesion, invasion and translocation characteristics of *Listeria monocytogenes* serotypes in Caco-2 cell and mouse models. *Appl Environ Microbiol.* 2003; 69: 3640-5.

Jones D, Seeliger HPR. The Genus *Listeria*. In: Balows A, Trüper HG, Dworkin M et al (eds). *The Prokaryotes*. 2ed. Springer-Verlag; 1991. v. II. p. 1598-1616.

Jonquieres R, Bierne H, Fiedler F, Gounon P, Cossart P. Interaction between the protein InlB of *Listeria monocytogenes* and lipoteichoic acid: a novel mechanism of protein association at the surface of Gram positive bacteria. *Mol Microbiol.* 1999; 34:902–914.

Jung H C, Eckmann L, Yang SK, Panja A, Fierer J, Morzyckawroblewska E, Kagnoff MF. A distinct array of proinflammatory cytokines is expressed in human colon epithelial cells in response to bacterial invasion. *J. Clin. Invest.* 1995; 95: 55–65.

Kanuka H, Sawamoto K, Inohara N, Matsuno K, Okano H, Miura M. Control of the cell death pathway by Dapaf-1, a *Drosophila* Apaf-1/CED-4- related caspase activator. *Mol Cell.* 1999; 4: 757-69.

Kaplan R, Jaye M, Burgess WH, Schlaepfer DD, Haigler HT: Cloning and expression of cDNA for human endonexin II, a Ca^{2+} and phospholipid binding protein. *J Biol Chem.* 1988; 263: 8037–43.

Kathariou S, Rocourt J, Hof H, Goebel W. Levels of *Listeria monocytogenes* hemolysin are not directly proportional to virulence in experimental infections of mice. *Infect Immun.* 1988; 56: 534-6.

Kerr, JFR, Searle J, Harmon BV, Bishop CJ. Apoptosis. In: C.S. POTTEN, editor. Perspectives on mammalian cell death. Oxford, Oxford University Press, 1987. p. 93-128.

Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer.* 1972; 26: 239–57.

Khelef N, Lecuit M, Bierne H, Cossart P. Species specificity of the *Listeria monocytogenes* InlB protein. *Cell Microbiol.* 2006; 8: 457–70.

Knutton S, Baldwin T, Williams PH. Actin accumulation at sites of bacterial adhesion to tissue culture cells: basis of a new diagnostic test for enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 1989; 57: 1290-8.

Koopman G, Reutelingsperger CP, Kuijten GA, et al. Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood*. 1994; 84: 1415–20.

Kosmider B, Zyner E, Osiecka R, Ochocki J. Induction of apoptosis and necrosis in A549 cells by the cis-Pt(II) complex of 3-aminoflavone in comparison with cis-DDP. *Mutat Res*. 2004; 563: 61-70.

Kothakota S, Azuma T, Reinhard C, Klippel A, Tang J, Chu K, McGarry TJ, Kirschner MW, Kohts K, Kwiatkowski DJ, Williams LT. Caspase-3-Generated Fragment of Gelsolin: Effector of Morphological Change in Apoptosis. *Science*. 1997; 278: 294-8.

Krueger JM, Fang J, Taishi P, Chen Z, Kushikata T, Gardi J. Sleep. A physiologic role for IL-1 beta and TNF-alpha. *Ann. N. Y. Acad. Sci*. 1998; 856: 148–59.

Lajarin F, Rubio G, Galvez J, Garcia-Peñarrubia P. Adhesion, invasion and intracellular replication of *Salmonella* Typhimurium in a murine hepatocyte cell line. Effect of cytokines and LPS on antibacterial activity of hepatocytes. *Microbial Pathogenesis*. 1996; 21: 319-29.

Lalmanach AC, Lantier F. Host cytokine response and resistance to *Salmonella* infection. *Microbes and Infection*. 1999; 1: 719-26.

Lazebnik YA, Takahashi A, Moir RD, Goldman RD, Poirier GG, Kaufmann SH, Earnshaw WC. Studies of the lamin proteinase reveal multiple parallel biochemical pathways during apoptotic execution. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1995; 92: 9042–6.

Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmad M, Alnemri ES, Wang X. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell*. 1997; 91: 479–89.

Lorber B. Listeriosis. *Clin. Infect. Dis*. 1997; 24: 1–11.

Luo G, Niesel DW, Shaban RA, Grimm EA, Klimpel GR. Tumor necrosis factor alpha binding to bacteria: evidence for a high-affinity receptor and alteration of bacterial virulence properties. *Infect. Immun*. 1993; 61: 830–5.

Mackaness GB. Cellular resistance to infection. *J. Exp. Med*. 1962; 116: 381–406.

Malheiros OS, Paula CMD, Tondo EC. Cinética de crescimento de *Salmonella* Enteritidis envolvida em surtos alimentares no RS: uma comparação com linhagens de outros sorovares. *Ciênc. Tecnol. Aliment*. 2007; 27: 751-5.

Malhi H., Gores GJ. Cellular and Molecular Mechanisms of Liver Injury. *Gastroenterology*. 2008; 134: 1641–54.

Marcus SL, Brumell JH, Pfeifer CG, Finlay BB. *Salmonella* pathogenicity islands: big virulence in small packages. *Microbes Infect* v. 2000; 2: 145–56.

Martin OC, Pagano RE. Transbilayer movement of fluorescent analogs of phosphatidylserine and phosphatidylethanolamine at the plasma membrane of cultured cells. Evidence for a protein-mediated and ATP-dependent process(es). *J. Biol. Chem.* 1987; 262: 5890–8.

Martin SJ, Reutelingsperger CPM, McGahon AJ, Rader JA, van Schie RCAA, LaFace DM, Green DR. Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. *J Exp Med*. 1995; 182: 1545–56.

Maurer Fogy I, Reutelingsperger CP, Pieters J, Bodo G, Stratowa C, Hauptmann R: Cloning and expression of cDNA for human vascular anticoagulant, a Ca^{2+} -dependent phospholipid-binding protein. *Eur J Biochem*. 1988; 174: 585–92.

McCarthy NJ, Whyte MKB, Gilbert CS, Evan GI. Inhibition of Ced-3/ICE-related proteases does not prevent cell death induced by oncogenes, DNA damage, or the Bcl-2 homologue Bak. *J. Cell Biol.* 1997; 136: 215–27.

McCormick BA, Colgan SP, Delp-Archer C, Miller SI, Madara JL. *Salmonella* Typhimurium attachment to human intestinal epithelial monolayers: transcellular signalling to subepithelial neutrophils. *J Cell Biol.* 1993; 123: 895–907.

McGee ZA, Clemens CM. Effect of bacterial products on tumor necrosis factor production: quantitation in biological fluids or tissues. *Meth. Enzymol.* 1994; 236: 23-31.

Mehlen P, Kretz-Remy C, Prévaille X, Arrigo AP. Human hsp 27 and human $\alpha\beta$ -crystallin expression-mediated increase in glutathione is essential for the protective activity of these proteins against TNF- α induced cell death. *EMBO J.* 1996; 15: 2695-706.

Menagud J, Ohayon H, Gounon P, Mège RM, Cossart P. E-cadherin is the receptor for internalin, a surface protein required for entry of *Listeria monocytogenes* into epithelial cells. *Cell.* 1996; 84: 923–32.

Messam CA, Pittman RN. Asynchrony and commitment to die during apoptosis. *Exp. Cell. Res.* 1998; 238: 389–98.

Meyer A, Corboz L, Straumann-Kunz U, Pospischil A. Infections with enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) in cattle. 1. Comparison of different animal models and a cell culture system for the establishment of a detection system for "attaching and effacing" (AE) lesions. *Zentralbl Veterinarmed B.* 1992; 39: 575-84.

Mochizuki H, Nakamura N, Nishi K, Mizuno Y. Apoptosis is induced by 1-methyl-4-phenylpyridinium ion (MPP⁺) in ventral mesencephalic-striatal co-culture in rat. *Neurosci. Lett.* 1994; 170: 191-4.

Moorhead G, Dykes A. The Role of the sigB Gene in the General Stress Response of *Listeria monocytogenes* Varies between a Strain of Serotype ½ a and a Strain of Serotype 4c. *Current Microbiol.* 2003; 46: 461-6.

Moura RAA, Purchio A, Rossi ALR, Strufaldi B, Nogueira DM, Hoxter G, Coutinho JO, Almeida TV. *Técnicas de Laboratório*. 2.ed. Rio de Janeiro: Atheneu; 1982.

Murray EGD, Webb RA, Swann MBR. A disease of rabbits characterized by a large mononuclear leukocytosis, caused by a hitherto undescribed bacillus *Bacterium monocytogenes*. *J. Pathol. Bacteriol.* 1926; 29: 407-39.

Nelson KE, Fouts DE, Mongosin EF, Ravel J, DeBoy RT, Kolonay JF, Rasko DA, Angiuoli SV, Gill SR, Paulsen IT, Peterson J, White O, Nelson WC, Nierman W, Beanan MJ, Brinkac LM, Daugherty SC, Dodson RJ, Durkin AS, Madupu R, Haft DH, Selengut J, Van Aken S, Khouri H, Fedorova N, Forberger H, Tran B, Kathariou S, Wonderling LD, Uhlich GA, Bayles DO, Luchansky JB, Fraser C.M. Whole genome comparisons of serotype 4b and 1/2 strains of the food-borne pathogen *Listeria monocytogenes* reveal new insights into the core genome components of this species *Nucleic Acids Research*. 2004; 32: 2386-95.

Nicholson DW. ICE/CED30-like proteases as therapeutic targets for the control of inappropriate apoptosis. *Nature Biotechnol.* 1996; 14: 297-301.

Nicholson DW, Ali A, Thornberry NA, Vaillancourt JP, Ding CK, Gallant M, Gareau Y, Griffin PR, Labelle M, Lazebnik YA, Munday NA, Raju SM, Smulson ME, Yamin T, Yu VL, Miller DK. Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis. *Nature*. 1995; 376: 37-43.

Oaks EV, Wingfield ME, Formal SB. Plaque formation by virulent *Shigella flexneri*. *Infection and Immunity*. 1985; 48: 124-9.

Op den Kamp J.A. Lipid asymmetry in membranes. *Annu. Rev. Biochem.* 1979; 48: 47-71.

Orlinick JR, Chao MV. TNF-related ligands and their receptors. *Cell Signal*, 1998; 10: 543–51.

Patel T, Gores GJ. Apoptosis and hepatobiliary disease. *Hepatology*. 1995; 21: 1725-41.

Patel JC, Galan JE. Manipulation of the host actin cytoskeleton by *Salmonella*—all in the name of entry. *Curr. Opin. Microbiol*. 2005; 8: 10–15.

Pentecost M, Otto G, Theriot JA, Amieva MR. *Listeria monocytogenes* invades the epithelial junctions at sites of cell extrusion. *Plos Pathog*. 2006; 2: 0029–0040.

Peter ME, Krammer PH. The CD95(APO-1/Fas) DISC and beyond. *Cell Death Differ*. 2003; 10: 26–35.

Portnoy D, Jacks PS, Hinrichs D. Role of hemolysin for the intracellular growth of *Listeria monocytogenes*. *J. Exp. Med*. 1988; 167: 1459–71.

Raynal P, Pollard HB. Annexins: The problem of assessing the biological role for a gene family of multifunctional calcium and phospholipid-binding proteins. *Biochemica et Biophysica Acta*. 1994; 1197: 63-93.

Renatus M, Stennicke HR, Scott FL, Liddington RC, Salvesen GS. Dimer formation drives the activation of the cell death protease caspase 9. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2001; 98: 14250–5.

Reutelingsperger CPM, Heerde WL. Annexin V, the regulator of phosphatidylserine-catalyzed inflammation and coagulation during apoptosis. *Cell. mol. life sci.* 1997; 53: 527–32.

Reutelingsperger CP, Hornstra G, Hemker HC: Isolation and partial purification of a novel anticoagulant from arteries of human umbilical cord. *Eur J Biochem.* 1985; 151: 625–9.

Riedl SJ, Fuentes-Prior P, Renatus M, Kairies N, Krapp S, Huber R, Salvesen GS, Bode W. Structural basis for the activation of human procaspase-7. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2001a; 98: 14790–5.

Riedl SJ, Renatus M, Schwarzenbacher R, Zhou Q, Sun C, Fesik SW, Liddington RC, Salvesen GS. Structural basis for the inhibition of caspase-3 by XIAP. *Cell* v. 2001b; 104: 791–800.

Roche SM, Velge P, Bottreau E, Durier C, Marquet-van der Mee N, Pardon P. Assessment of the virulence of *Listeria monocytogenes*: agreement between a plaque-forming assay with HT-29 cells and infection of immunocompetent mice. *Int J Food Microbiol.* 2001; 68: 33-44.

Rodriguez A, Oliver H, Zou H, Chen P, Wang X, Abrams JM. Dark is a *Drosophila* homologue of Apaf-1/CED-4 and functions in an evolutionarily conserved death pathway. *Nat Cell Biol.* 1999; 1: 272-9.

Rodriguez J, Lazebnik Y. Caspase-9 and APAF-1 form an active holoenzyme. *Genes Dev.* 1999; 13: 3179-84.

Rogers HW, Callery MP, Deck B, Unanue ER. *Listeria monocytogenes* induces apoptosis in infected hepatocytes. *J. Immunol.* 1996; 156: 679–84.

Rosen H, Gordon S, North RJ. Exacerbation of murine listeriosis by a monoclonal antibody specific for the type 3 complement receptor of myelomonocytic cells. Absence of monocytes at infective foci allows *Listeria* to multiply in nonphagocytic cells. *J. Exp. Med.* 1989; 170: 27-37.

Rosing J, Bevers EM, Comfurius P, Hemker HC, Van Dieijen G, Weiss HJ, Zwaal RF. Impaired factor X and prothrombin activation associated with a decreased phospholipids exposure in platelets from a patient with a bleeding disorder. *Blood.* 1985a; 65: 1557–61.

Rosser BG, Gores GJ. Liver cell necrosis: cellular mechanisms and clinical implications. *Gastroenterology.* 1995; 108: 252-75.

Rowell L, Eckmann L, Dwinell MB, Carpenter SP, Raucy JL, Yang SK, Kagnoff MF. Human hepatocytes express an array of proinflammatory cytokines after agonist stimulation of bacterial invasion. *Am. J. Physiol.* 1997; 273: G322-G332.

Russel SW, Rosenau W, Lee JC. Cytolysis induced by human lymphotoxin. *Ann J Pathol.* 1972; 69: 103-18.

Salvesen GS, Dixit VM. Caspase activation: the induced-proximity model. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1999; 96: 10964-7.

Salvesen GS, Duckett CS. IAP proteins: Blocking the road to death's door. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2002; 3: 401–10.

Sanderson CJ. The mechanism of T cell mediated cytotoxicity II. Morphological studies of cell death by time lapse microcinematography. *Proc Roy Soc Lond B.* 1976; 192: 241-55.

Santos SA, Andrade DR, Andrade Júnior DR. Rat hepatocyte invasion by *Listeria monocytogenes* and analysis of TNF alpha role in apoptosis. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo.* 2005; 47: 73-80.

Schlegel J, Peters I, Orrenius S, Miller DK, Thornberry NA, Ting-Ting Yamin T, Nicholson DW. CPP32/Apopain Is a Key Interleukin 1b Converting

Enzyme-like Protease Involved in Fas-mediated Apoptosis. *J. Biol. Chem.* 1996; 271: 1841-4.

Schroit AJ, Zwaai RF. Transbilayer movement of phospholipids in red cell and platelet membranes. *Biochim. Biophys. Acta.* 1991; 1071: 313–29.

Seeliger HPR, Jones D. *Listeria*. In: Sneath PHA et al.(eds). *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 9th ed. Baltimore: Williams e Wilkins; 1986. v. 2, p. 1235-45.

Seigneuret M, Devaux PF. ATP-dependent asymmetric distribution of spin-labeled phospholipids in the erythrocyte membrane: relation to shape changes. *Proc. Natl. Acad. Sc.* 1984; 81: 3751–5.

Sgonc R, Boeck G, Dietrich H, Gruber J, Recheis H, Wick G. Simultaneous determination of cell surface antigens and apoptosis. *Trends Genet.* 1994; 10: 41-2.

Shen Y, Naujokas M, Park M, Ireton K. InlB dependent internalization of *Listeria* is mediated by the Met receptor tyrosine kinase. *Cell.* 2000; 103: 501–10.

SHI Y. A conserved tetrapeptide motif: Potentiating apoptosis through IAP-binding. *Cell Death Differ.* 2002a; 9: 93–5.

SHI Y. A structural view of mitochondria-mediated apoptosis. *Nat. Struct. Biol.* 2001; 8: 394–401.

SHI Y. Caspase activation, inhibition, and reactivation: A mechanistic view. *Protein Sci.* 2004; 13: 1979-87.

SHI Y. Mechanisms of caspase inhibition and activation during apoptosis. *Mol. Cell.* 2002; 9: 459–70.

Spriggs M. One step ahead of the game: viral immunomodulatory molecules. *Annu. Rev. Immunol.* 1996; 14: 101-30.

Srinivasula SM, Ahmad M, Fernandes-Alnemri T, Litwack G, Alnemri ES. Molecular ordering of the Fas-apoptotic pathway: The FasyAPO-1 protease Mch5 is a CrmA-inhibitable protease that activates multiple Ced-3/Ice-like cysteine proteases. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1996; 93: 14486-91.

Srinivasula SM, Saleh A, Hedge R, Datta P, Shiozaki E, Chai J, Robbins PD, Fernandes-Alnemri T, Shi Y, Alnemri ES. A conserved XIAP-interaction motif in caspase-9 and Smac/DIABLO mediates opposing effects on caspase activity and apoptosis. *Nature.* 2001; 409: 112–6.

Steller H. Mechanisms and genes of cellular suicide. *Science*. 1995; 267: 1445–9.

Stennicke HR, Deveraux QL, Humke EW, Reed JC, Dixit VM, Salvesen GS. Caspase-9 can be activated without proteolytic processing. *J. Biol. Chem*. 1999; 274: 8359–62.

Suzuki K, Kostin S, Person V, Elsasser A, Schaper J. Time Course of the Apoptotic Cascade and Effects of Caspase Inhibitors in Adult Rat Ventricular Cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol*, 2001; 33: p. 983–94.

Tait JF, Gibson D, Fujikawa K: Phospholipid binding properties of human placental anticoagulant protein-I, a member of the lipocortin family. *J Biol Chem*. 1989; 264: 7944–9.

Tewari M, Quan LT, O'Rourke K, Desnoyer S, Zeng Z, Beidler DR, Poirier GG, Salvesen GS, Dixit VM. Yama/CPP32 beta, a mammalian homolog of CED-3, is a CrmA-inhibitable protease that cleaves the death substrate poly(ADP-ribose) polymerase. *Cell*. 1995; 81: 801-9.

Tinel A., Tschopp J. The PIDDosome, a protein complex implicated in activation of caspase-2 in response to genotoxic stress. *Science*. 2004; 304: 843–6.

Ton-That H, Marraffini LA, Schneewind O. Protein sorting to the cell wall envelope of Gram-positive bacteria. *Biochem Biophys Acta*, 2004; 1694: 269–78.

Tschopp J, Martinon F, Burns K. NALPs: A novel protein family involved in inflammation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2003; 4: 95–104.

Vanags DM, Porn Ares MI, Coppola S, Burgess DH, Orrenius S: Protease involvement in fodrin cleavage and phosphatidylserine exposure in apoptosis. *J Biol Chem.* 1996; 271: 31075–85.

Vaux DL, Strasser A. The molecular biology of apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1996; 93: 2239-44.

Vazquez-Boland JA, Dominguez-Bernal G, Gonzalez-Zorn B, Kreft J, Goebel W. Pathogenicity islands and virulence evolution in *Listeria*. *Microbes Infect.* 2001; 3: 571–84.

Vazquez-Boland JA, Kuhn M, Berche P, Chakraborty T, Dominguez-Bernal G, Goebel W, González-Zorn B, Wehland J, Kreft J. *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. *Clin Microbiol Rev.* 2001a; 14: 584–640.

Verhagen AM, Ekert PG, Pakusch M, Silke J, Connolly LM, Reid GE, Moritz RL, Simpson RJ e Vaux DL. Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell*. 2000; 102: 43–53.

Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutelingsperger C. A novel assay for apoptosis: flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluoresceinlabelledannexin V. *J Immunol Methods*. 1995; 184: 39 –51.

Vilcek J, Lee TH. Tumor necrosis factor.New insights into the molecular mechanisms of its multiple actions.*J. Biol. Chem*. 1991; 266: 7313–6.

Vo ATT, Duijkeren EV, Fluit AC, Hendriks HGCJM, Tooten PCJ, Gastra W. Comparison of the *in vitro* pathogenicity of two *Salmonella* Typhimurium phage types. *Comp Immun Microbiol Infect Dis*. 2007; 30: 11–18.

Wei Y, Fox T, Chambers SP, Sintchak JA, Coll JT, Golec JMC, Swenson L, Wilson KP, Charifson PS. The structures of caspases-1, -3, -7 and -8 reveal the basis for substrate and inhibitor selectivity. *Chem. Biol*. 2000; 7: 423–32.

Weiss H J. Scott syndrome: a disorder of platelet coagulant activity. *Semin. Hematol*. 1994; 31: 312–9.

Wood S, Maroushek N, Czuprynski CJ. Multiplication of *Listeria monocytogenes* in a murine hepatocyte cell line. *Infect. Immun.* 1993; 61: 3068-72.

World Health Organization (WHO). World Health Report, 2007.

Worley MJ, Nieman GS, Geddes K, Heffron F. *Salmonella* Typhimurium disseminates within its host by manipulating the motility of infected cells. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 2006; 103: 17915–20.

Wride MA, Sanders EJ. Potential roles for tumour necrosis factor alpha during embryonic development. *Anat. Embryol. (Berl)*. 1995; 191: 1–10.

Wyllie AH. Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature*. 1980; 284: 555-6.

Yan N, Wu JW, Huh JR, Chai J, Li W, Hay BA, Shi Y. Molecular mechanisms of DrICE inhibition by DIAP1 and removal of inhibition by Reaper, Hid, and Grim. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2004; 11: 420–8.

Yuan J. Transducing signals of life and death. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 1997; 9: 247–51.

Yuan J, Shaham S, Ledoux S, Ellis HM, Horvitz HR. The *C. elegans* cell death gene *Ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 γ -converting enzyme. *Cell*. 1993; 75: 641–52.

Zachowski A. Phospholipids in animal eukaryotic membranes: transverse asymmetry and movement. *Biochem. J.* 1993; 294: 1–14.

Zachowski A, Herrmann A, Paraf A, Devaux P.F. Phospholipid outside–inside translocation in lymphocyte plasma membranes is a protein-mediated phenomenon. *Biochim. Biophys. Acta*. 1987; 897: 197–200.

Zhou L, Song Z, Tittel J, Steller H. HAC-1, a *Drosophila* homolog of APAF-1 and CED-4 functions in developmental and radiation-induced apoptosis. *Mol Cell*. 1999; 4: 745–55.

Zou H, Henzel WJ, Liu X., Lutschg A, Wang X. Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome-c-dependent activation of Caspase-3. *Cell*. 1997; 90: 405–13.

Zwaal RF, Schroit AJ. Pathophysiologic implications of membrane phospholipid asymmetry in blood cells. *Blood*. 1997; 89: 1121–32.

APÊNDICE I

Tabela 6 – Variação da liberação de TNF-alfa por hepatócitos invadidos por *S. Typhimurium* e *L. monocytogenes* sorogrupos 4a, 4b e 1/2a

Grupos Experimentais	TNF-alfa (pg/mL) (média)
Controle negativo 1h	0
Controle negativo 2h	0
Controle negativo 3h	11
Controle negativo 4h	20,65
Controle negativo 5h	12,43
Controle negativo 6h	13,87
Controle positivo (estaurosporina) 1h	49,44312
Controle positivo (estaurosporina) 2h	60,28473
Controle positivo (estaurosporina) 3h	77,456
Controle positivo (estaurosporina) 4h	85,67
Controle positivo (estaurosporina) 5h	91,2535
Controle positivo (estaurosporina) 6h	102,56
ST-1h (5×10^5)	23,2854
ST-1h (5×10^6)	42,3589
ST-1h (5×10^7)	48,0236
ST-1h (5×10^8)	51,2658
ST-1h (5×10^9)	71,2896
ST-1h (5×10^{10})	79,64478
ST-2h (5×10^5)	56,0253
ST-2h (5×10^6)	85,84001
ST-2h (5×10^7)	87,38879
ST-2h (5×10^8)	102,3564
ST-2h (5×10^9)	121,3569
ST-2h (5×10^{10})	133,2356
ST-3h (5×10^5)	75,2586
ST-3h (5×10^6)	87,5689
ST-3h (5×10^7)	126,3256
ST-3h (5×10^8)	133,0785
ST-3h (5×10^9)	223,2125
ST-3h (5×10^{10})	398,5623
ST-4h (5×10^5)	125,2368
ST-4h (5×10^6)	136,2358
ST-4h (5×10^7)	169,2359
ST-4h (5×10^8)	199,2358
ST-4h (5×10^9)	365,2358
ST-4h (5×10^{10})	558,4589
ST-5h (5×10^5)	155,488
ST-5h (5×10^6)	210,458

continua

Grupos Experimentais	TNF-alfa (pg/mL) (média)
ST-5h (5x10 ⁷)	241,029
ST-5h (5x10 ⁸)	456,378
ST-5h (5x10 ⁹)	410,389
ST-5h (5x10 ¹⁰)	597,237
ST-6h (5x10 ⁵)	158,46
ST-6h (5x10 ⁶)	203,55
ST-6h (5x10 ⁷)	388,5
ST-6h (5x10 ⁸)	549,32
ST-6h (5x10 ⁹)	597,36
ST-6h (5x10 ¹⁰)	714,65
LM 4a-1h (5x10 ⁵)	1,5789
LM 4a-1h (5x10 ⁶)	21,2358
LM 4a-1h (5x10 ⁷)	28,5698
LM 4a-1h (5x10 ⁸)	34,7295
LM 4a-1h (5x10 ⁹)	45,5711
LM 4a-1h (5x10 ¹⁰)	74,9984
LM 4a-2h (5x10 ⁵)	19,5689
LM 4a-2h (5x10 ⁶)	60,2865
LM 4a-2h (5x10 ⁷)	76,5472
LM 4a-2h (5x10 ⁸)	80,5998
LM 4a-2h (5x10 ⁹)	91,2385
LM 4a-2h (5x10 ¹⁰)	119,236
LM 4a-3h (5x10 ⁵)	56,8954
LM 4a-3h (5x10 ⁶)	66,2865
LM 4a-3h (5x10 ⁷)	76,5472
LM 4a-3h (5x10 ⁸)	90,2358
LM 4a-3h (5x10 ⁹)	99,5682
LM 4a-3h (5x10 ¹⁰)	221,236
LM 4a-4h (5x10 ⁵)	99,5685
LM 4a-4h (5x10 ⁶)	121,278
LM 4a-4h (5x10 ⁷)	144,266
LM 4a-4h (5x10 ⁸)	158,266
LM 4a-4h (5x10 ⁹)	224,589
LM 4a-4h (5x10 ¹⁰)	231,032
LM 4a-5h (5x10 ⁵)	111,857
LM 4a-5h (5x10 ⁶)	150,567
LM 4a-5h (5x10 ⁷)	185,738
LM 4a-5h (5x10 ⁸)	208,195
LM 4a-5h (5x10 ⁹)	401,857
LM 4a-5h (5x10 ¹⁰)	487,236
LM 4a-6h (5x10 ⁵)	130,755
LM 4a-6h (5x10 ⁶)	165,603

continua

Grupos Experimentais	TNF-alfa (pg/mL) (média)
LM 4a-6h (5x10 ⁷)	205,098
LM 4a-6h (5x10 ⁸)	255,746
LM 4a-6h (5x10 ⁹)	402,336
LM 4a-6h (5x10 ¹⁰)	503,256
LM 4b-1h (5x10 ⁵)	2,20466
LM 4b-1h (5x10 ⁶)	25,2368
LM 4b-1h (5x10 ⁷)	31,0256
LM 4b-1h (5x10 ⁸)	38,2357
LM 4b-1h (5x10 ⁹)	39,2358
LM 4b-1h (5x10 ¹⁰)	42,4735
LM 4b-2h (5x10 ⁵)	25,0358
LM 4b-2h (5x10 ⁶)	39,472
LM 4b-2h (5x10 ⁷)	55,236
LM 4b-2h (5x10 ⁸)	67,2543
LM 4b-2h (5x10 ⁹)	71,9008
LM 4b-2h (5x10 ¹⁰)	74,9984
LM 4b-3h (5x10 ⁵)	45,5711
LM 4b-3h (5x10 ⁶)	51,3685
LM 4b-3h (5x10 ⁷)	70,2896
LM 4b-3h (5x10 ⁸)	75,0285
LM 4b-3h (5x10 ⁹)	85,84
LM 4b-3h (5x10 ¹⁰)	115,239
LM 4b-4h (5x10 ⁵)	51,2385
LM 4b-4h (5x10 ⁶)	77,2366
LM 4b-4h (5x10 ⁷)	89,2356
LM 4b-4h (5x10 ⁸)	105,747
LM 4b-4h (5x10 ⁹)	136,176
LM 4b-4h (5x10 ¹⁰)	225,24
LM 4b-5h (5x10 ⁵)	98,2658
LM 4b-5h (5x10 ⁶)	117,236
LM 4b-5h (5x10 ⁷)	127,658
LM 4b-5h (5x10 ⁸)	129,369
LM 4b-5h (5x10 ⁹)	150,204
LM 4b-5h (5x10 ¹⁰)	298,026
LM 4b-6h (5x10 ⁵)	151,237
LM 4b-6h (5x10 ⁶)	155,266
LM 4b-6h (5x10 ⁷)	154,267
LM 4b-6h (5x10 ⁸)	160,588
LM 4b-6h (5x10 ⁹)	188,061
LM 4b-6h (5x10 ¹⁰)	468,394
LM 1/2a-1h (5x10 ⁵)	8,0258
LM 1/2a-1h (5x10 ⁶)	28,5343

continua

Grupos Experimentais	TNF-alfa (pg/mL) (média)
LM 1/2a-1h (5x10 ⁷)	33,0253
LM 1/2a-1h (5x10 ⁸)	42,3568
LM 1/2a-1h (5x10 ⁹)	51,7663
LM 1/2a-1h (5x10 ¹⁰)	86,2356
LM 1/2a-2h (5x10 ⁵)	41,3589
LM 1/2a-2h (5x10 ⁶)	55,6892
LM 1/2a-2h (5x10 ⁷)	56,2358
LM 1/2a-2h (5x10 ⁸)	71,1263
LM 1/2a-2h (5x10 ⁹)	88,9376
LM 1/2a-2h (5x10 ¹⁰)	145,258
LM 1/2a-3h (5x10 ⁵)	66,2385
LM 1/2a-3h (5x10 ⁶)	81,2658
LM 1/2a-3h (5x10 ⁷)	85,2358
LM 1/2a-3h (5x10 ⁸)	116,816
LM 1/2a-3h (5x10 ⁹)	131,853
LM 1/2a-3h (5x10 ¹⁰)	160,183
LM 1/2a-4h (5x10 ⁵)	76,5472
LM 1/2a-4h (5x10 ⁶)	89,1752
LM 1/2a-4h (5x10 ⁷)	99,5785
LM 1/2a-4h (5x10 ⁸)	132,304
LM 1/2a-4h (5x10 ⁹)	159,239
LM 1/2a-4h (5x10 ¹⁰)	171,024
LM 1/2a-5h (5x10 ⁵)	78,5896
LM 1/2a-5h (5x10 ⁶)	104,426
LM 1/2a-5h (5x10 ⁷)	119,587
LM 1/2a-5h (5x10 ⁸)	158,835
LM 1/2a-5h (5x10 ⁹)	171,024
LM 1/2a-5h (5x10 ¹⁰)	201,587
LM 1/2a-6h (5x10 ⁵)	75,3358
LM 1/2a-6h (5x10 ⁶)	177,83
LM 1/2a-6h (5x10 ⁷)	201,359
LM 1/2a-6h (5x10 ⁸)	248,599
LM 1/2a-6h (5x10 ⁹)	335,686
LM 1/2a-6h (5x10 ¹⁰)	406,442

Tabela 23 – Porcentagens de apoptose obtidas pela técnica TUNEL

Grupos experimentais	% de apoptose
Controle negativo-1h	17,86
Controle negativo-2h	17,28
Controle negativo-3h	13,13
Controle negativo-4h	18,46
Controle negativo-5h	11,57
Controle negativo-6h	18,5
Controle positivo (Dnase)	66,9
Controle Positivo (Staurosporina overnight)	47,87
ST-1h (5×10^5)	10,3
ST-1h (5×10^6)	16,1
ST-1h (5×10^7)	16,62
ST-1h (5×10^8)	13,4
ST-1h (5×10^9)	16,8
ST-1h (5×10^{10})	15,8
ST-2h (5×10^5)	15,42
ST-2h (5×10^6)	18,93
ST-2h (5×10^7)	19,65
ST-2h (5×10^8)	20,37
ST-2h (5×10^9)	21,84
ST-2h (5×10^{10})	21,56
ST-3h (5×10^5)	19,79
ST-3h (5×10^6)	20,61
ST-3h (5×10^7)	22,7
ST-3h (5×10^8)	26,43
ST-3h (5×10^9)	32
ST-3h (5×10^{10})	36,58
ST-4h (5×10^5)	10,36
ST-4h (5×10^6)	15,98
ST-4h (5×10^7)	22,95
ST-4h (5×10^8)	36,55
ST-4h (5×10^9)	42,68
ST-4h (5×10^{10})	51,88
ST-5h (5×10^5)	15,81
ST-5h (5×10^6)	20,09
ST-5h (5×10^7)	24,79
ST-5h (5×10^8)	28,18
ST-5h (5×10^9)	29,23
ST-5h (5×10^{10})	43,66

continua

Grupos experimentais	% de apoptose
ST-6h (5x10 ⁵)	9,36
ST-6h (5x10 ⁶)	21,03
ST-6h (5x10 ⁷)	29,96
ST-6h (5x10 ⁸)	36,24
ST-6h (5x10 ⁹)	36,8
ST-6h (5x10 ¹⁰)	56,3
LM 4a-1h (5x10 ⁵)	17,3
LM 4a-1h (5x10 ⁶)	23,33
LM 4a-1h (5x10 ⁷)	23,37
LM 4a-1h (5x10 ⁸)	27,2
LM 4a-1h (5x10 ⁹)	28,25
LM 4a-1h (5x10 ¹⁰)	28,36
LM 4a-2h (5x10 ⁵)	10,87
LM 4a-2h (5x10 ⁶)	14,22
LM 4a-2h (5x10 ⁷)	18,2
LM 4a-2h (5x10 ⁸)	20,12
LM 4a-2h (5x10 ⁹)	24,58
LM 4a-2h (5x10 ¹⁰)	38,19
LM 4a-3h (5x10 ⁵)	21,01
LM 4a-3h (5x10 ⁶)	22,49
LM 4a-3h (5x10 ⁷)	25,89
LM 4a-3h (5x10 ⁸)	26,22
LM 4a-3h (5x10 ⁹)	31,25
LM 4a-3h (5x10 ¹⁰)	33,69
LM 4a-4h (5x10 ⁵)	18,17
LM 4a-4h (5x10 ⁶)	19,9
LM 4a-4h (5x10 ⁷)	25,41
LM 4a-4h (5x10 ⁸)	29,92
LM 4a-4h (5x10 ⁹)	30,55
LM 4a-4h (5x10 ¹⁰)	36,41
LM 4a-5h (5x10 ⁵)	27
LM 4a-5h (5x10 ⁶)	32,03
LM 4a-5h (5x10 ⁷)	34,17
LM 4a-5h (5x10 ⁸)	36,87
LM 4a-5h (5x10 ⁹)	38,44
LM 4a-5h (5x10 ¹⁰)	39,68
LM 4a-6h (5x10 ⁵)	16,85
LM 4a-6h (5x10 ⁶)	18,85
LM 4a-6h (5x10 ⁷)	19,78
LM 4a-6h (5x10 ⁸)	21,86

continua

Grupos experimentais	% de apoptose
LM 4a-6h (5x10 ⁹)	22,21
LM 4a-6h (5x10 ¹⁰)	32,9
LM 4b-1h (5x10 ⁵)	12,47
LM 4b-1h (5x10 ⁶)	25,54
LM 4b-1h (5x10 ⁷)	28,35
LM 4b-1h (5x10 ⁸)	32,25
LM 4b-1h (5x10 ⁹)	32,59
LM 4b-1h (5x10 ¹⁰)	34,52
LM 4b-2h (5x10 ⁵)	22,6
LM 4b-2h (5x10 ⁶)	26,88
LM 4b-2h (5x10 ⁷)	26,09
LM 4b-2h (5x10 ⁸)	28,91
LM 4b-2h (5x10 ⁹)	30,05
LM 4b-2h (5x10 ¹⁰)	37,46
LM 4b-3h (5x10 ⁵)	19,19
LM 4b-3h (5x10 ⁶)	24,87
LM 4b-3h (5x10 ⁷)	28,23
LM 4b-3h (5x10 ⁸)	36,57
LM 4b-3h (5x10 ⁹)	37,76
LM 4b-3h (5x10 ¹⁰)	40,69
LM 4b-4h (5x10 ⁵)	15,3
LM 4b-4h (5x10 ⁶)	18,8
LM 4b-4h (5x10 ⁷)	28,96
LM 4b-4h (5x10 ⁸)	29,63
LM 4b-4h (5x10 ⁹)	30,41
LM 4b-4h (5x10 ¹⁰)	37,74
LM 4b-5h (5x10 ⁵)	19,32
LM 4b-5h (5x10 ⁶)	28,41
LM 4b-5h (5x10 ⁷)	29,49
LM 4b-5h (5x10 ⁸)	30,01
LM 4b-5h (5x10 ⁹)	36,53
LM 4b-5h (5x10 ¹⁰)	39,27
LM 4b-6h (5x10 ⁵)	11,81
LM 4b-6h (5x10 ⁶)	17,28
LM 4b-6h (5x10 ⁷)	20,74
LM 4b-6h (5x10 ⁸)	22,93
LM 4b-6h (5x10 ⁹)	29,41
LM 4b-6h (5x10 ¹⁰)	42,12
LM 1/2a-1h (5x10 ⁵)	13,1
LM 1/2a-1h (5x10 ⁶)	17,71

continua

Grupos experimentais	% de apoptose
LM 1/2a-1h (5×10^7)	18,9
LM 1/2a-1h (5×10^8)	33,14
LM 1/2a-1h (5×10^9)	34,39
LM 1/2a-1h (5×10^{10})	39,71
LM 1/2a-2h (5×10^5)	14,2
LM 1/2a-2h (5×10^6)	15,07
LM 1/2a-2h (5×10^7)	16,47
LM 1/2a-2h (5×10^8)	28,49
LM 1/2a-2h (5×10^9)	31,57
LM 1/2a-2h (5×10^{10})	39,6
LM 1/2a-3h (5×10^5)	19,79
LM 1/2a-3h (5×10^6)	21,67
LM 1/2a-3h (5×10^7)	24,73
LM 1/2a-3h (5×10^8)	29,34
LM 1/2a-3h (5×10^9)	35,83
LM 1/2a-3h (5×10^{10})	40,99
LM 1/2a-4h (5×10^5)	22,88
LM 1/2a-4h (5×10^6)	24,21
LM 1/2a-4h (5×10^7)	25,21
LM 1/2a-4h (5×10^8)	26,6
LM 1/2a-4h (5×10^9)	33,1
LM 1/2a-4h (5×10^{10})	33,29
LM 1/2a-5h (5×10^5)	22,26
LM 1/2a-5h (5×10^6)	23,6
LM 1/2a-5h (5×10^7)	25,5
LM 1/2a-5h (5×10^8)	34,53
LM 1/2a-5h (5×10^9)	36,67
LM 1/2a-5h (5×10^{10})	42,57
LM 1/2a-6h (5×10^5)	13,62
LM 1/2a-6h (5×10^6)	22,45
LM 1/2a-6h (5×10^7)	26,68
LM 1/2a-6h (5×10^8)	30,38
LM 1/2a-6h (5×10^9)	42,25
LM 1/2a-6h (5×10^{10})	57,23

Tabela 28 – Médias das porcentagens de apoptose obtidas pela técnica da anexina

Grupos Experimentais	% de apoptose	% de necrose	% Apoptose tardia
Controle Positivo (Staurosporina-1h)	0,13	0,26	1,76
Controle Positivo (Staurosporina-2h)	1,76	9,25	2,24
Controle Positivo (Staurosporina-3h)	2,56	2,98	1,86
Controle Positivo (Staurosporina-4h)	1,75	3,67	2,54
Controle Positivo (Staurosporina-5h)	3,45	5,67	1,97
Controle Positivo (Staurosporina-6h)	18,96	2,51	12,36
Controle Positivo (Staurosporina-overnight)	35,11	2,13	14,45
Controle negativo	1,32	5,3	1,7
ST-1h (5×10^5)	0,01	5,2	2,34
ST-1h (5×10^6)	1,01	4,98	3,4
ST-1h (5×10^7)	0,78	15,7	2,34
ST-1h (5×10^8)	4,34	7,98	5,42
ST-1h (5×10^9)	4,32	8,67	10,22
ST-1h (5×10^{10})	4,56	9,87	12,34
ST-2h (5×10^5)	1,04	11,52	1,75
ST-2h (5×10^6)	1,26	14,51	2,31
ST-2h (5×10^7)	1,51	13,17	2,04
ST-2h (5×10^8)	4,55	26,53	14,09
ST-2h (5×10^9)	9,3	16,76	13,56

continua

Grupos Experimentais	% de apoptose	% de necrose	% Apoptose tardia
ST-2h (5x10 ¹⁰)	7,17	15,88	11
ST-3h (5x10 ⁵)	0,05	6,13	3,12
ST-3h (5x10 ⁶)	1,22	5,43	3,8
ST-3h (5x10 ⁷)	0,98	17,78	1,63
ST-3h (5x10 ⁸)	5,37	8,51	6,42
ST-3h (5x10 ⁹)	6,77	9,98	8,13
ST-3h (5x10 ¹⁰)	12,65	14,5	22,21
ST-4h (5x10 ⁵)	1,57	14,96	5,55
ST-4h (5x10 ⁶)	3,74	22,1	11,28
ST-4h (5x10 ⁷)	2,57	12,23	7,47
ST-4h (5x10 ⁸)	4,07	18,48	12,11
ST-4h (5x10 ⁹)	7,23	13,45	9,08
ST-4h (5x10 ¹⁰)	15,43	17,87	14,2
ST-5h (5x10 ⁵)	0	0,29	0,28
ST-5h (5x10 ⁶)	0,11	1,96	1,84
ST-5h (5x10 ⁷)	0	3,51	1,76
ST-5h (5x10 ⁸)	6,1	20,79	15,27
ST-5h (5x10 ⁹)	9,11	8,18	13,68
ST-5h (5x10 ¹⁰)	20,86	1,9	14,67
ST-6h (5x10 ⁵)	3,22	1,76	1,44
ST-6h (5x10 ⁶)	15,95	8,24	20,98
ST-6h (5x10 ⁷)	17,21	7,02	14,32
ST-6h (5x10 ⁸)	16,99	6,03	19,54

continua

Grupos Experimentais	% de apoptose	% de necrose	% Apoptose tardia
ST-6h (5x10 ⁹)	19,15	5,869	17,39
ST-6h (5x10 ¹⁰)	30,99	2,39	15,35
LM 4a-1h (5x10 ⁵)	1,32	15,55	2,56
LM 4a-1h (5x10 ⁶)	0,94	5,72	1,97
LM 4a-1h (5x10 ⁷)	1,3	6,98	1,8
LM 4a-1h (5x10 ⁸)	3,94	40,80	13,82
LM 4a-1h (5x10 ⁹)	5,52	20,65	13,96
LM 4a-1h (5x10 ¹⁰)	5,29	16,73	5,69
LM 4a-2h (5x10 ⁵)	0,74	14,30	3,92
LM 4a-2h (5x10 ⁶)	6,01	1,63	2,15
LM 4a-2h (5x10 ⁷)	7,4	9,23	5,68
LM 4a-2h (5x10 ⁸)	10,3	12,1	10,6
LM 4a-2h (5x10 ⁹)	10,09	12,14	10,94
LM 4a-2h (5x10 ¹⁰)	12,4	7,6	13,4
LM 4a-3h (5x10 ⁵)	0,12	11,05	0,68
LM 4a-3h (5x10 ⁶)	1,44	11,58	5,57
LM 4a-3h (5x10 ⁷)	3,16	12,52	8,15
LM 4a-3h (5x10 ⁸)	4,88	24,85	13,61
LM 4a-3h (5x10 ⁹)	13,45	7,89	10,33
LM 4a-3h (5x10 ¹⁰)	23,46	8,08	19,86
LM 4a-4h (5x10 ⁵)	0,78	16,39	4,92
LM 4a-4h (5x10 ⁶)	1,23	17,52	5,03
LM 4a-4h (5x10 ⁷)	4,59	18,97	9,63

continua

Grupos Experimentais	% de apoptose	% de necrose	% Apoptose tardia
LM 4a-4h (5x10 ⁸)	5,83	21,23	16,61
LM 4a-4h (5x10 ⁹)	12,68	6,89	10,23
LM 4a-4h (5x10 ¹⁰)	26,58	2,46	19,47
LM 4a-5h (5x10 ⁵)	0,05	2,26	2,86
LM 4a-5h (5x10 ⁶)	0	4,61	3,4
LM 4a-5h (5x10 ⁷)	2,98	20,79	15,61
LM 4a-5h (5x10 ⁸)	9,87	6,59	8,78
LM 4a-5h (5x10 ⁹)	19,87	6,35	10,68
LM 4a-5h (5x10 ¹⁰)	33,48	3,74	15,91
LM 4a-6h (5x10 ⁵)	0,05	0,49	1,68
LM 4a-6h (5x10 ⁶)	0	4,95	2,82
LM 4a-6h (5x10 ⁷)	2,55	12,81	9,39
LM 4a-6h (5x10 ⁸)	5,63	11,32	14,71
LM 4a-6h (5x10 ⁹)	26,58	2,46	19,47
LM 4a-6h (5x10 ¹⁰)	37,28	1,86	39,94
LM 4b-1h (5x10 ⁴)	0,57	22,57	1,41
LM 4b-1h (5x10 ⁵)	1,77	8,32	2,07
LM 4b-1h (5x10 ⁶)	3,16	9,70	13,82
LM 4b-1h (5x10 ⁷)	4,24	10,27	17,26
LM 4b-1h (5x10 ⁸)	4,84	16,71	9,53
LM 4b-1h (5x10 ⁹)	7,12	12,56	20,78
LM 4b-1h (5x10 ¹⁰)	8,8	13,26	23,14
LM 4b-2h (5x10 ⁵)	1,94	15,45	10,71

continua

Grupos Experimentais	% de apoptose	% de necrose	% Apoptose tardia
LM 4b-2h (5x10 ⁶)	2,35	4,59	3,56
LM 4b-2h (5x10 ⁷)	5,09	23,44	6,23
LM 4b-2h (5x10 ⁸)	7,26	13,85	6,12
LM 4b-2h (5x10 ⁹)	17,8	4,05	13,84
LM 4b-2h (5x10 ¹⁰)	20,92	5,47	18,63
LM 4b-3h (5x10 ⁵)	0,1	9,45	0,39
LM 4b-3h (5x10 ⁶)	1,69	14,78	5,59
LM 4b-3h (5x10 ⁷)	2,79	13,2	6,97
LM 4b-3h (5x10 ⁸)	10,23	5,89	8,98
LM 4b-3h (5x10 ⁹)	18,97	9,58	15,63
LM 4b-3h (5x10 ¹⁰)	21,58	6,98	16,98
LM 4b-4h (5x10 ⁵)	3,56	2,98	3,21
LM 4b-4h (5x10 ⁶)	6,67	7,54	13,47
LM 4b-4h (5x10 ⁷)	10,44	14,18	28,09
LM 4b-4h (5x10 ⁸)	15,98	21,58	26,58
LM 4b-4h (5x10 ⁹)	21,89	28,74	29,87
LM 4b-4h (5x10 ¹⁰)	29,87	35,69	36,85
LM 4b-5h (5x10 ⁵)	0	5,08	2,49
LM 4b-5h (5x10 ⁶)	0	7,36	2,88
LM 4b-5h (5x10 ⁷)	0	9,29	2,5
LM 4b-5h (5x10 ⁸)	12,36	6,58	6,58
LM 4b-5h (5x10 ⁹)	16,8	8,65	8,69
LM 4b-5h (5x10 ¹⁰)	34,58	16,98	17,89

continua

Grupos Experimentais	% de apoptose	% de necrose	% Apoptose tardia
LM 4b-6h (5x10 ⁵)	0,01	2,43	1,31
LM 4b-6h (5x10 ⁶)	1,98	8,93	3,04
LM 4b-6h (5x10 ⁷)	5,53	2,43	2,77
LM 4b-6h (5x10 ⁸)	21,69	10,36	15,69
LM 4b-6h (5x10 ⁹)	35,69	12,36	15,3
LM 4b-6h (5x10 ¹⁰)	47,94	4,59	24,85
LM 1/2a-1h (5x10 ⁴)	1,59	13,00	8,78
LM 1/2a-1h (5x10 ⁵)	1,71	10,32	2,51
LM 1/2a-1h (5x10 ⁶)	1,61	11,7	1,82
LM 1/2a-1h (5x10 ⁷)	3	18,24	6,3
LM 1/2a-1h (5x10 ⁸)	5,79	7,33	21,61
LM 1/2a-1h (5x10 ⁹)	10,91	13,93	16,9
LM 1/2a-1h (5x10 ¹⁰)	26,55	3,87	14,65
LM 1/2a-2h (5x10 ⁵)	1,05	13,74	3,63
LM 1/2a-2h (5x10 ⁶)	8,17	1,25	2,04
LM 1/2a-2h (5x10 ⁷)	10,13	8,24	15,07
LM 1/2a-2h (5x10 ⁸)	13,6	11,5	18,9
LM 1/2a-2h (5x10 ⁹)	17,11	9,05	20,74
LM 1/2a-2h (5x10 ¹⁰)	20,06	5,59	16,09
LM 1/2a-3h (5x10 ⁵)	0,09	4,31	0,25
LM 1/2a-3h (5x10 ⁶)	1,98	18,75	5,97
LM 1/2a-3h (5x10 ⁷)	2,18	12,21	7,75
LM 1/2a-3h (5x10 ⁸)	8,69	26,3	20,36

continua

Grupos Experimentais	% de apoptose	% de necrose	% Apoptose tardia
LM 1/2a-3h (5x10 ⁹)	13,25	3,6	9,36
LM 1/2a-3h (5x10 ¹⁰)	16,95	2,31	13,17
LM 1/2a-4h (5x10 ⁵)	0,62	12,48	2,97
LM 1/2a-4h (5x10 ⁶)	5,21	21,36	17,72
LM 1/2a-4h (5x10 ⁷)	6,91	23	15,74
LM 1/2a-4h (5x10 ⁸)	7,69	16,36	10,25
LM 1/2a-4h (5x10 ⁹)	12,3	24,3	14,25
LM 1/2a-4h (5x10 ¹⁰)	15,6	21,3	16,3
LM 1/2a-5h (5x10 ⁵)	0,01	9,07	3,33
LM 1/2a-5h (5x10 ⁶)	0	0,68	0,32
LM 1/2a-5h (5x10 ⁷)	0	4,95	2,7
LM 1/2a-5h (5x10 ⁸)	6,09	1,8	1,89
LM 1/2a-5h (5x10 ⁹)	10,3	3,62	5,63
LM 1/2a-5h (5x10 ¹⁰)	18,6	7,56	10,3
LM 1/2a-6h (5x10 ⁵)	0	3,02	1,89
LM 1/2a-6h (5x10 ⁶)	0	8,62	1,75
LM 1/2a-6h (5x10 ⁷)	2,62	7,97	3,99
LM 1/2a-6h (5x10 ⁸)	4,69	8,6	5,8
LM 1/2a-6h (5x10 ⁹)	13,6	21,6	15,6
LM 1/2a-6h (5x10 ¹⁰)	15,6	22,9	14,8

APÊNDICE II

Figura 29 – Frequência de apoptose em hepatócitos controle-negativos e controle-positivos (TUNEL)

Figura 30 – Frequência de apoptose em hepatócitos invadidos por *S Typhimurium* (TUNEL)

Figura 31 – Frequência de apoptose em hepatócitos invadidos por *L.monocytogenes* 4a (TUNEL)

Figura 32 – Frequência de apoptose em hepatócitos invadidos por *L.monocytogenes* 4b (TUNEL)

Figura 33 – Frequência de apoptose em hepatócitos invadidos por *L. monocytogenes* 1/2a (TUNEL)

Figura 37 – Frequência de apoptose (anexina) em hepatócitos controle-positivos (estaurosporina) e controle-negativos (ausência de estímulo apoptótico)

Figura 38 – Frequência de apoptose em hepatócitos invadidos entre 1h e 6h por *S. Typhimurium* em diferentes concentrações (anexina)

Figura 39 – Frequência de apoptose em hepatócitos invadidos por *L. monocytogenes* 4a entre 1h e 6h de incubação em diferentes concentrações (anexina)

Figura 40 – Frequência de apoptose em hepatócitos invadidos entre 1h e 6h por *L. monocytogenes* 4b em diferentes concentrações (anexina)

Figura 41 – Frequência de apoptose em hepatócitos invadidos entre 1h e 6h por *L. monocytogenes* 1/2a em diferentes concentrações (anexina)