UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos
Área de Bromatologia

Heterogeneidade da virulência de cepas de *Listeria monocytogenes*,
pertencentes a diferentes sorotipos, isoladas de amostras de alimento, do
ambiente de processamento e de amostra clínica

Cristina Durante Cruz

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientador:
Profa. Dra. Maria Teresa Destro
Co-orientador:
Profa. Dra. Marina Baquerizo Martinez

São Paulo
2007

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos
Área de Bromatologia

Heterogeneidade da virulência de cepas de *Listeria monocytogenes*,
pertencentes a diferentes sorotipos, isoladas de amostras de alimento, do
ambiente de processamento e de amostra clínica

Cristina Durante Cruz

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientador:
Profa. Dra. Maria Teresa Destro
Co-orientador:
Profa. Dra. Marina Baquerizo Martinez

São Paulo
2007

Cristina Durante Cruz

Heterogeneidade da virulência de cepas de *Listeria monocytogenes*,
pertencentes a diferentes sorotipos, isoladas de amostras de alimento, do
ambiente de processamento e de amostra clínica

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do grau de Doutor

Profa. Dra. Maria Teresa Destro
orientador/presidente

1º. examinador

2º. examinador

3º. examinador

4º. examinador

São Paulo, 2 de julho de 2007.

Aos meus queridos pais, Luiz César e Eliza.

Em nome de todos os filhos, agradeço a vocês por tudo o que fizeram por nós. O amor os levou a correr todos os riscos do mundo por nossa causa. Vocês não deram tudo o que queriam para cada filho, mas deram tudo o que tinham. Vocês deixaram seus sonhos, para que pudéssemos sonhar. Deixaram seu lazer, para que tivéssemos alegria. Perderam noites de sono, para que dormíssemos tranquilos. Derramaram lágrimas, para que fôssemos felizes.

Muito obrigada!!

Héctor, amor meu

“...aquí estic, estimant la sinceritat de les teves mans, només et vull
dir quant t'enyoro...”

(Alonso Lopes Miranda)

"A persistência é o caminho do êxito."

(Charles Chaplín)

AGRADECIMENTOS

À Dra. Maria Teresa Destro, que orientou-me com dedicação na realização deste projeto. Obrigada pelos “puxões de orelha” para que eu crescesse pessoalmente e profissionalmente.

À Dra. Marina Baquerizo Martinez, por aceitar e encarar este “desafio” junto comigo, contribuindo com idéias valiosas. Considero você uma de minhas orientadoras.

À Dra. Mariza Landgraf e à Dra. Bernadete Dory Gombossy de Melo Franco, pelo carinho com que me receberam e pelo apoio nestes anos.

Aos meus irmãos, Guilherme e Gustavo, minha querida cunhadinha Aline e minha linda sobrinha Julia, que trazem sempre alegria a minha vida.

Aos amigos Cristiano, Eb, Janine, Paulo e Ricardo, pelos bons tempos em que passamos juntos no Laboratório de Microbiologia de Alimentos.

À Kátia e Lúcia, pela amizade, pelo carinho, pelas risadas e por sempre estarem dispostas a ajudar.

À Dra. Andréia Hanada Otake, mais conhecida como Buzu, por sua amizade, companheirismo e carinho que sempre demonstrou ao longo destes 10 anos. Você é muito mais que uma simples amiga. Obrigada também pelas discussões sobre os ensaios de morte celular.

À amiga Izabel, que é uma fonte de inspiração, de coragem e de garra. Obrigada pelas análises estatísticas que foram realizadas com muito profissionalismo e carinho.

Às colegas do Laboratório de Microbiologia Clínica, Ana Carolina e Juliana pelo auxílio nos experimentos com culturas celulares.

À Universidade de Bristol, por possibilitar o desenvolvimento de meu estágio na Inglaterra.

Ao Dr. José Antônio Vazquez-Boland e à Dra. Mariela Scotti, pela oportunidade de estar realizando parte da minha tese em seu laboratório.

Aos colegas do Grupo de Patogênese Molecular Veterinária: Allain, David, Debbie, Hector, Magda e Lizeth, por dividirem suas experiências científicas comigo e me receberem de braços abertos.

Aos colegas: Ana, Atila, Catarina, Francisco, Gaby, Guillaume, Jeremie, Marga, Salvador, Soledad, pelas festas, jantares e almoços em Langford (“the middle of nowhere”).

Às minhas grandes amigas, Ana Rita e Sherazad, que foram a minha família durante minha vida na Inglaterra.

À Elaine Midori Ychico e ao Jorge Alves de Lima pelo auxílio durante minha pós-graduação.

Às bibliotecárias Leila Aparecida Bonadio e Maria Luiza T. do Carmo, pela revisão das referências bibliográficas e elaboração da ficha catalográfica.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão da bolsa de doutorado e pelo financiamento do projeto.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pela concessão da bolsa do Programa de Doutorado no país com Estágio no Exterior (PDPEE).

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	xi
ABSTRACT	xiii
ÍNDICE DE TABELAS.....	xv
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xvi
1. INTRODUÇÃO.....	24
1.1. Enfermidades Transmitidas por Alimentos (ETA).....	24
1.2. <i>Listeria</i>, listeriose e sua importância.....	25
1.2.1. Histórico.....	25
1.2.2. Situação atual.....	27
1.3. Determinantes moleculares de virulência e mecanismo de regulação..	33
1.4. Ciclo Intracelular de Infecção.....	37
1.4.1. Internalização e colonização.....	37
1.4.2. Escape do fagossomo primário.....	41
1.4.3. Multiplicação citoplasmática.....	42
1.4.4. Movimentação intra e intercelular.....	43
1.4.5. Escape do fagossomo secundário.....	44
1.5. Diversidade na virulência entre cepas de <i>L. monocytogenes</i>.....	44
2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS.....	54
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	56
3.1. Material.....	56
3.1.1. Cepas de <i>L. monocytogenes</i>	56
3.1.2. Células eucarióticas.....	57
3.2. Métodos.....	57

3.2.1. Preparo dos inóculos bacterianos.....	57
3.2.2. Células eucarióticas.....	58
3.2.3. Curvas de crescimento.....	58
3.2.4. Atividade hemolítica e fosfolipídica.....	59
3.2.5. Ensaio de Invasão.....	59
3.2.6. Ensaio de Proliferação.....	60
3.2.7. Ensaio de Citopatogenicidade.....	61
3.2.8. Ensaio de Citotoxicidade.....	62
3.2.8.1. Liberação da enzima lactato desidrogenase (LDH).....	62
3.2.8.2. Ensaio de morte celular.....	63
3.2.9. Visualização dos filamentos de actina.....	64
3.2.10. Transcrição gênica de <i>plcA</i> , <i>plcB</i> e <i>actA</i>	65
3.2.11. Análise estatística.....	70
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	72
4.1. Curvas de crescimento de cepas de <i>L. monocytogenes</i> em meio de cultura.....	72
4.2. Atividade hemolítica e fosfolipídica de cepas de <i>L. monocytogenes</i> em meio de cultura.....	74
4.3. Avaliação da capacidade invasiva de cepas de <i>L. monocytogenes</i> em células eucarióticas.....	78
4.4. Proliferação intracelular de cepas de <i>L. monocytogenes</i> em células eucarióticas.....	87
4.5. Disseminação intercelular de cepas de <i>L. monocytogenes</i> em células eucarióticas.....	103
4.6. Avaliação da citotoxicidade de cepas de <i>L. monocytogenes</i> às células eucarióticas.....	113
4.6.1. Liberação da enzima lactato desidrogenase (LDH) por células eucarióticas infectadas com cepas de <i>L. monocytogenes</i>	114

4.6.2. Morte celular de células eucarióticas infectadas por cepas de <i>L. monocytogenes</i>	120
4.7. Polimerização do filamento de actina de cepas de <i>L. monocytogenes</i> em células eucarióticas.....	128
4.8. Transcrição gênica de <i>plcA</i>, <i>plcB</i> e <i>actA</i> de cepas de <i>L. monocytogenes</i> em células eucarióticas.....	133
5. CONCLUSÕES.....	140
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	142
ANEXO A	167

RESUMO

CRUZ, C. D. **Heterogeneidade da virulência de cepas de *Listeria monocytogenes*, pertencentes a diferentes sorotipos, isoladas de amostras de alimento, do ambiente de processamento e de amostra clínica.** 2007. 167 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

Listeria monocytogenes é um patógeno intracelular facultativo responsável por listeriose, uma doença de origem alimentar. Dentre os 13 sorotipos de *L. monocytogenes* existentes, o sorotipo 4b é o mais freqüentemente isolado de humanos, enquanto os sorotipos 1/2a, 1/2b e 1/2c são mais freqüentes em alimentos e amostras ambientais. O estudo da variabilidade de virulência de quatro cepas de *L. monocytogenes* recentemente isoladas (1/2B - alimento; 1/2C e 4BENV - ambiente de processamento de alimento; 4BCLIN - sangue), além de duas outras cepas de casos de listeriose (P14 e P14A), foi o objetivo deste trabalho. Avaliou-se a capacidade de invasão, proliferação intracelular, citotoxicidade, disseminação intercelular, polimerização de filamentos de actina e transcrição gênica dos genes de virulência *actA*, *plcA* e *plcB* das cepas em modelos celulares eucarióticos MDBK, HeLa e L929. A cepa de origem alimentar 1/2B apresentou características de invasão, taxa de multiplicação (IGC), assim como a disseminação intercelular, semelhantes às cepas clínicas P14 e 4BCLIN em células HeLa. As cepas de origem ambiental (1/2C e 4BENV), apesar da baixa capacidade de invasão em todas linhagens celulares empregadas, apresentaram IGC superior às demais cepas estudadas e disseminação intercelular superior ou similar às cepas clínicas, dependendo da célula eucariótica. As cepas de origem clínica 4BCLIN, P14, P14A tiveram maiores porcentagens de invasão nas linhagens MDBK e L929, porém, em relação à população

intracelular (UFC/mL), as cepas 4BCLIN e P14A foram superiores às demais. Estas últimas também foram citotóxicas às células HeLa, induzindo à liberação de LDH e à morte por necrose. Já as cepas de origem alimentar, ambiental e a cepa clínica P14 não foram citotóxicas às células HeLa e MDBK. Em relação à polimerização dos filamentos de actina não houve diferença estatística entre as cepas. Todos os genes de virulência estudados apresentaram maior número de transcritos para as cepas de origem não clínica (1/2B, 1/2C e 4BENV). Sendo assim, todas as cepas de *L. monocytogenes* estudadas possuem potencial patogênico, por apresentar pelo menos duas características relacionadas à virulência da espécie. Alimentos possivelmente contaminados com estas cepas representam risco à saúde pública.

Palavras-chave: *Listeria monocytogenes*, sorotipos, alimento contaminado, virulência, cultura celular.

ABSTRACT

CRUZ, C. D. **Virulence heterogeneity of *Listeria monocytogenes* strains isolates from, food, food processing line and clinical samples belonging to different serotypes.** 2007. 167 f. Thesis (PhD) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

Listeria monocytogenes is a facultative intracellular pathogen responsible for listeriose, a foodborne disease. Amongst the 13 serotypes of *L. monocytogenes*, the serotype 4b is more frequently isolated from clinical samples while the serotypes 1/2a, 1/2b and 1/2c are associated with food and food processing environment. The study of the virulence variability of four *L. monocytogenes* strains recently isolated (1/2B - food; 1/2C and 4BENV - food processing environment; 4BCLIN – blood), as well as two strains of listeriosis (P14 and P14A) was the aim of this work. Eukaryotic cellular models HeLa, MDBK and L929 were used to evaluate the invasion capacity, intracellular proliferation, cytotoxicity, intercellular dissemination and polymerization of actin tails of *L. monocytogenes* strains. Gene transcription of the virulence genes *actA*, *plcA* and *plcB* was also conducted. The food isolate 1/2B presented invasion characteristics, multiplication index (IGC), as well as the intercellular dissemination, similar to the clinical strains P14 and 4BCLIN in HeLa cells. Environmental strains (1/2C and 4BENV), although showing a low capacity of invasion in all cellular models, had the highest IGC comparing to the other isolates. They also showed similar to or higher intercellular dissemination than the clinical ones, depending on the cell line used. The clinical strains 4BCLIN, P14, P14A presented greater invasion capacity in MDBK and L929 cells than all other isolates. However, in relation to the intracellular population (CFU/mL) the isolates 4BCLIN and P14A showed superior results. These strains were also cytotoxic to HeLa cells, inducing

LDH release and death due to necrosis. The food, environmental and P14 isolates were not cytotoxic to HeLa and MDBK cells. There was no statistical difference in actin tail polymerization between the strains. The non-clinical isolates (1/2B, 1/2C and 4BENV) presented higher number of transcripts for than the clinical ones. In conclusion, all *L. monocytogenes* strains studied showed pathogenic potential, based on expression of at least two characteristics related to the virulence of the species. The presence of these strains in food represents public health risk.

Key-words: *Listeria monocytogenes*, serotypes, contaminated food, virulence, cell culture.

ÍNDICE DE TABELAS

	Página
Tabela 1 – Cepas de <i>L. monocytogenes</i> utilizadas neste estudo.....	56
Tabela 2 – Oligonucleotídeos empregados neste estudo.....	69
Tabela 3 – Sumário dos principais resultados obtidos nos ensaios realizados com cepas de <i>L. monocytogenes</i>	137

ÍNDICE DE FIGURAS

		Página
Figura 1.	Representação esquemática da organização e controle de regulação de alguns genes de virulência de <i>L. monocytogenes</i> (fonte: adaptado de Milohanic <i>et al.</i> , 2003).....	35
Figura 2.	Ciclo de vida intracelular de <i>L. monocytogenes</i> (fonte: adaptado de Tilney; Portnoy, 1989).....	38
Figura 3.	Representação gráfica das estratégias de invasão celular de <i>L. monocytogenes</i> (fonte: adaptado de Pizarro-Cerda; Cossart, 2006).....	40
Figura 4.	Curvas de crescimento de cepas de <i>L. monocytogenes</i> a 37°C, sob agitação de 200 rpm, em um intervalo de 9 horas de incubação. Média de três experimentos em duplicata. 1/2B: sorotipo 1/2b (alimento); 1/2C: sorotipo 1/2c (ambiente); 4BENV: sorotipo 4b (ambiente); 4BCLIN: sorotipo 4b (sangue).....	73
Figura 5.	Atividade fosfolípídica (A), efeito do carvão (B) e atividade hemolítica (C) das cepas de <i>L. monocytogenes</i> . A – Ágar BHI + emulsão de gema de ovo, B – Ágar BHI + emulsão de gema de ovo + carvão ativado, C - Ágar Sangue. 1/2B: sorotipo 1/2b (alimento); 1/2C: sorotipo 1/2c (ambiente); 4BENV: sorotipo 4b (ambiente); 4BCLIN, P14, P14A e $\Delta prfA$: sorotipo 4b (sangue)....	77
Figura 6.	<i>Box plot</i> da capacidade invasiva de cepas de <i>L. monocytogenes</i> em células epiteliais HeLa. A mediana está representada por uma linha horizontal dentro da caixa e a média pelos círculos pretos. Média de três experimentos em duplicata. Para letras iguais não há diferença estatística entre as cepas ($p > 0,05$). 1/2B: sorotipo 1/2b (alimento); 1/2C: sorotipo 1/2c (ambiente); 4BENV: sorotipo 4b (ambiente); 4BCLIN, P14 e P14A: sorotipo 4b (sangue).....	80
Figura 7.	<i>Box plot</i> da capacidade invasiva de cepas de <i>L. monocytogenes</i> em células epiteliais MDBK. A mediana está representada por uma linha horizontal dentro da caixa e a média pelos círculos pretos. Média de dois experimentos em duplicata. Para letras iguais não há diferença estatística entre as cepas ($p > 0,05$). 1/2B: sorotipo 1/2b (alimento); 1/2C: sorotipo 1/2c (ambiente); 4BENV: sorotipo 4b (ambiente); 4BCLIN, P14 e P14A: sorotipo 4b (sangue).....	81

- Figura 8.** *Box plot* da capacidade invasiva de cepas de *L. monocytogenes* em fibroblastos L929. A mediana está representada por uma linha horizontal dentro da caixa e a média pelos círculos pretos. Média de dois experimentos em duplicata. Para letras iguais não há diferença estatística entre as cepas ($p>0,05$). 1/2B: sorotipo 1/2b (alimento); 1/2C: sorotipo 1/2c (ambiente); 4BENV: sorotipo 4b (ambiente); 4BCLIN, P14 e P14A: sorotipo 4b (sangue)..... **82**
- Figura 9.** Proliferação de cepas de *L. monocytogenes* em células epiteliais HeLa no tempos de 0, 4, 8 e 24 horas pós-infecção. Média de dois experimentos em duplicata representada em escala logarítmica. 1/2B: sorotipo 1/2b (alimento); 1/2C: sorotipo 1/2c (ambiente); 4BENV: sorotipo 4b (ambiente); 4BCLIN, P14 e P14A: sorotipo 4b (sangue)..... **89**
- Figura 10.** Proliferação intracelular (UFC/mL) de cepas de *L. monocytogenes* no tempo 0 em células epiteliais HeLa. Média de dois experimentos em duplicata representada em escala logarítmica. Para letras iguais não há diferença estatística entre as cepas ($p>0,05$). 1/2B: sorotipo 1/2b (alimento); 1/2C: sorotipo 1/2c (ambiente); 4BENV: sorotipo 4b (ambiente); 4BCLIN, P14 e P14A: sorotipo 4b (sangue)..... **89**
- Figura 11.** Proliferação intracelular (UFC/mL) de cepas de *L. monocytogenes* em células epiteliais HeLa 4 horas pós-infecção. Média de dois experimentos em duplicata representada em escala logarítmica. Para letras iguais não há diferença estatística entre as cepas ($p>0,05$). 1/2B: sorotipo 1/2b (alimento); 1/2C: sorotipo 1/2c (ambiente); 4BENV: sorotipo 4b (ambiente); 4BCLIN, P14 e P14A: sorotipo 4b (sangue)..... **90**
- Figura 12.** Proliferação intracelular (UFC/mL) de cepas de *L. monocytogenes* em células epiteliais HeLa 8 horas pós-infecção. Média de dois experimentos em duplicata representada em escala logarítmica. Para letras iguais não há diferença estatística entre as cepas ($p>0,05$). 1/2B: sorotipo 1/2b (alimento); 1/2C: sorotipo 1/2c (ambiente); 4BENV: sorotipo 4b (ambiente); 4BCLIN, P14 e P14A: sorotipo 4b (sangue)..... **90**
- Figura 13.** Proliferação intracelular (UFC/mL) de cepas de *L. monocytogenes* em células epiteliais HeLa 24 horas pós-infecção. Média de dois experimentos em duplicata representada em escala logarítmica. Para letras iguais não há diferença estatística entre as cepas ($p>0,05$). 1/2B: sorotipo 1/2b (alimento); 1/2C: sorotipo 1/2c (ambiente); 4BENV: sorotipo 4b (ambiente); 4BCLIN, P14 e P14A: sorotipo 4b (sangue)..... **91**

- Figura 14.** Coeficiente de proliferação intracelular (IGC) de cepas de *L. monocytogenes* em células epiteliais HeLa no tempos de 4, 8 e 24 horas pós-infecção. Média de dois experimentos em duplicata representada em escala logarítmica. 1/2B: sorotipo 1/2b (alimento); 1/2C: sorotipo 1/2c (ambiente); 4BENV: sorotipo 4b (ambiente); 4BCLIN, P14 e P14A: sorotipo 4b (sangue)..... **92**
- Figura 15.** Coeficiente de proliferação intracelular (IGC) de cepas de *L. monocytogenes* em células epiteliais HeLa 4 horas pós-infecção. Média de dois experimentos em duplicata representada em escala logarítmica. Para letras iguais não há diferença estatística entre as cepas ($p>0,05$). 1/2B: sorotipo 1/2b (alimento); 1/2C: sorotipo 1/2c (ambiente); 4BENV: sorotipo 4b (ambiente); 4BCLIN, P14 e P14A: sorotipo 4b (sangue)..... **92**
- Figura 16.** Coeficiente de proliferação intracelular (IGC) de cepas de *L. monocytogenes* em células epiteliais HeLa 8 horas pós-infecção. Média de dois experimentos em duplicata representada em escala logarítmica. Para letras iguais não há diferença estatística entre as cepas ($p>0,05$). 1/2B: sorotipo 1/2b (alimento); 1/2C: sorotipo 1/2c (ambiente); 4BENV: sorotipo 4b (ambiente); 4BCLIN, P14 e P14A: sorotipo 4b (sangue)..... **93**
- Figura 17.** Coeficiente de proliferação intracelular (IGC) de cepas de *L. monocytogenes* em células epiteliais HeLa 24 horas pós-infecção. Média de dois experimentos em duplicata representada em escala logarítmica. Para letras iguais não há diferença estatística entre as cepas ($p>0,05$). 1/2B: sorotipo 1/2b (alimento); 1/2C: sorotipo 1/2c (ambiente); 4BENV: sorotipo 4b (ambiente); 4BCLIN, P14 e P14A: sorotipo 4b (sangue)..... **93**
- Figura 18.** Proliferação de cepas de *L. monocytogenes* em células epiteliais MDBK nos tempos de 0, 4, 8 e 24 horas pós-infecção. Média de dois experimentos em duplicata representada em escala logarítmica. 1/2B: sorotipo 1/2b (alimento); 1/2C: sorotipo 1/2c (ambiente); 4BENV: sorotipo 4b (ambiente); 4BCLIN, P14 e P14A: sorotipo 4b (sangue)..... **95**
- Figura 19.** Proliferação intracelular (UFC/mL) de cepas de *L. monocytogenes* em células epiteliais MDBK no tempo 0. Média de dois experimentos em duplicata representada em escala logarítmica. Para letras iguais não há diferença estatística entre as cepas ($p>0,05$). 1/2B: sorotipo 1/2b (alimento); 1/2C: sorotipo 1/2c (ambiente); 4BENV: sorotipo 4b (ambiente); 4BCLIN, P14 e P14A: sorotipo 4b (sangue)..... **95**

- Figura 20.** Proliferação intracelular (UFC/mL) de cepas de *L. monocytogenes* em células epiteliais MDBK 4 horas pós-infecção. Média de dois experimentos em duplicata representada em escala logarítmica. Para letras iguais não há diferença estatística entre as cepas ($p>0,05$). 1/2B: sorotipo 1/2b (alimento); 1/2C: sorotipo 1/2c (ambiente); 4BENV: sorotipo 4b (ambiente); 4BCLIN, P14 e P14A: sorotipo 4b (sangue)..... **96**
- Figura 21.** Proliferação intracelular (UFC/mL) de cepas de *L. monocytogenes* em células epiteliais MDBK 8 horas pós-infecção. Média de dois experimentos em duplicata representada em escala logarítmica. Para letras iguais não há diferença estatística entre as cepas ($p>0,05$). 1/2B: sorotipo 1/2b (alimento); 1/2C: sorotipo 1/2c (ambiente); 4BENV: sorotipo 4b (ambiente); 4BCLIN, P14 e P14A: sorotipo 4b (sangue)..... **96**
- Figura 22.** Proliferação intracelular (UFC/mL) de cepas de *L. monocytogenes* em células epiteliais MDBK 24 horas pós-infecção. Média de dois experimentos em duplicata representada em escala logarítmica. Para letras iguais não há diferença estatística entre as cepas ($p>0,05$). 1/2B: sorotipo 1/2b (alimento); 1/2C: sorotipo 1/2c (ambiente); 4BENV: sorotipo 4b (ambiente); 4BCLIN, P14 e P14A: sorotipo 4b (sangue)..... **97**
- Figura 23.** Coeficiente de proliferação intracelular (IGC) de cepas de *L. monocytogenes* em células epiteliais MDBK nos tempos de 4, 8 e 24 horas pós-infecção. Média de dois experimentos em duplicata representada em escala logarítmica. 1/2B: sorotipo 1/2b (alimento); 1/2C: sorotipo 1/2c (ambiente); 4BENV: sorotipo 4b (ambiente); 4BCLIN, P14 e P14A: sorotipo 4b (sangue)..... **98**
- Figura 24.** Coeficiente de proliferação intracelular (IGC) de cepas de *L. monocytogenes* em células epiteliais MDBK 4 horas pós-infecção. Média de dois experimentos em duplicata representada em escala logarítmica. Para letras iguais não há diferença estatística entre as cepas ($p>0,05$). 1/2B: sorotipo 1/2b (alimento); 1/2C: sorotipo 1/2c (ambiente); 4BENV: sorotipo 4b (ambiente); 4BCLIN, P14 e P14A: sorotipo 4b (sangue)..... **98**
- Figura 25.** Coeficiente de proliferação intracelular (IGC) de cepas de *L. monocytogenes* em células epiteliais MDBK 8 horas pós-infecção. Média de dois experimentos em duplicata representada em escala logarítmica. Para letras iguais não há diferença estatística entre as cepas ($p>0,05$). 1/2B: sorotipo 1/2b (alimento); 1/2C: sorotipo 1/2c (ambiente); 4BENV: sorotipo 4b (ambiente); 4BCLIN, P14 e P14A: sorotipo 4b (sangue)..... **99**

- Figura 26.** Coeficiente de proliferação intracelular (IGC) de cepas de *L. monocytogenes* em células epiteliais MDBK 24 horas pós-infecção. Média de dois experimentos em duplicata representada em escala logarítmica. Para letras iguais não há diferença estatística entre as cepas ($p>0,05$). 1/2B: sorotipo 1/2b (alimento); 1/2C: sorotipo 1/2c (ambiente); 4BENV: sorotipo 4b (ambiente); 4BCLIN, P14 e P14A: sorotipo 4b (sangue)..... **99**
- Figura 27.** Formação de placas de lise em fibroblastos L929 por cepas de *L. monocytogenes* coradas com vermelho neutro após 72 horas de incubação. Resultado representativo de um experimento. 1/2B: sorotipo 1/2b (alimento); 1/2C: sorotipo 1/2c (ambiente); 4BENV: sorotipo 4b (ambiente); 4BCLIN, P14 e P14A: sorotipo 4b (sangue)..... **106**
- Figura 28.** Diâmetros dos halos de lise formados (mm) em fibroblastos L929 por cepas *L. monocytogenes* após 72 horas de incubação. Média de três experimentos em duplicata. Para letras iguais não há diferença estatística entre as cepas ($p>0,05$). 1/2B: sorotipo 1/2b (alimento); 1/2C: sorotipo 1/2c (ambiente); 4BENV: sorotipo 4b (ambiente); 4BCLIN, P14 e P14A: sorotipo 4b (sangue)..... **106**
- Figura 29.** Formação de placas de lise em células epiteliais MDBK por cepas de *L. monocytogenes* coradas com vermelho neutro após 72 horas de incubação. Resultado representativo de um experimento. 1/2B: sorotipo 1/2b (alimento); 1/2C: sorotipo 1/2c (ambiente); 4BENV: sorotipo 4b (ambiente); 4BCLIN, P14 e P14A: sorotipo 4b (sangue)..... **107**
- Figura 30.** Diâmetros dos halos de lise formados (mm) em células epiteliais MDBK por cepas *L. monocytogenes* após 72 horas de incubação. Média de dois experimentos em duplicata. Para letras iguais não há diferença estatística entre as cepas ($p>0,05$). 1/2B: sorotipo 1/2b (alimento); 1/2C: sorotipo 1/2c (ambiente); 4BENV: sorotipo 4b (ambiente); 4BCLIN, P14 e P14A: sorotipo 4b (sangue)..... **107**
- Figura 31.** Formação de placas de lise em células epiteliais HeLa por cepas de *L. monocytogenes* coradas com vermelho neutro após 72 horas de incubação. Resultado representativo de um experimento. 1/2B: sorotipo 1/2b (alimento); 1/2C: sorotipo 1/2c (ambiente); 4BENV: sorotipo 4b (ambiente); 4BCLIN, P14 e P14A: sorotipo 4b (sangue)..... **109**

- Figura 32.** Diâmetros dos halos de lise formados (mm) em células epiteliais HeLa por cepas *L. monocytogenes* após 72 horas de incubação. Média de dois experimentos em duplicata. Para letras iguais não há diferença estatística entre as cepas ($p>0,05$). 1/2B: sorotipo 1/2b (alimento); 1/2C: sorotipo 1/2c (ambiente); 4BENV: sorotipo 4b (ambiente); 4BCLIN, P14 e P14A: sorotipo 4b (sangue)..... **109**
- Figura 33.** Liberação de enzima lactato desidrogenase (LDH) por células epiteliais HeLa 8 horas pós-infecção com cepas de *L. monocytogenes*. Média de dois experimentos em duplicata. Para letras iguais não há diferença estatística entre as cepas ($p>0,05$). 1/2B: sorotipo 1/2b (alimento); 1/2C: sorotipo 1/2c (ambiente); 4BENV: sorotipo 4b (ambiente); 4BCLIN, P14 e P14A: sorotipo 4b (sangue)..... **115**
- Figura 34.** Liberação de enzima lactato desidrogenase (LDH) por células epiteliais HeLa 24 horas pós-infecção com cepas de *L. monocytogenes*. Média de dois experimentos em duplicata. Para letras iguais não há diferença estatística entre as cepas ($p>0,05$). 1/2B: sorotipo 1/2b (alimento); 1/2C: sorotipo 1/2c (ambiente); 4BENV: sorotipo 4b (ambiente); 4BCLIN, P14 e P14A: sorotipo 4b (sangue)..... **116**
- Figura 35.** Liberação de enzima lactato desidrogenase (LDH) por células epiteliais MDBK 8 horas pós-infecção com cepas de *L. monocytogenes*. Média de dois experimentos em duplicata. Para letras iguais não há diferença estatística entre as cepas ($p>0,05$). 1/2B: sorotipo 1/2b (alimento); 1/2C: sorotipo 1/2c (ambiente); 4BENV: sorotipo 4b (ambiente); 4BCLIN, P14 e P14A: sorotipo 4b (sangue)..... **117**
- Figura 36.** Liberação de enzima lactato desidrogenase (LDH) por células epiteliais MDBK 24 horas pós-infecção com cepas de *L. monocytogenes*. Média de dois experimentos em duplicata. Para letras iguais não há diferença estatística entre as cepas ($p>0,05$). 1/2B: sorotipo 1/2b (alimento); 1/2C: sorotipo 1/2c (ambiente); 4BENV: sorotipo 4b (ambiente); 4BCLIN, P14 e P14A: sorotipo 4b (sangue)..... **118**

- Figura 37.** Porcentagens de células epiteliais HeLa Anexina V⁺, características do processo apoptótico, 8 horas pós-infecção com cepas de *L. monocytogenes*, determinadas por citometria de fluxo. Média de dois experimentos em duplicata. Para letras iguais não há diferença estatística entre as cepas ($p>0,05$). 1/2B: sorotipo 1/2b (alimento); 1/2C: sorotipo 1/2c (ambiente); 4BENV: sorotipo 4b (ambiente); 4BCLIN, P14 e P14A: sorotipo 4b (sangue)..... **121**
- Figura 38.** Porcentagens de células epiteliais HeLa IP⁺, características do processo necrótico, 8 horas pós-infecção com cepas de *L. monocytogenes*, determinadas por citometria de fluxo. Média de dois experimentos em duplicata. Para letras iguais não há diferença estatística entre as cepas ($p>0,05$). 1/2B: sorotipo 1/2b (alimento); 1/2C: sorotipo 1/2c (ambiente); 4BENV: sorotipo 4b (ambiente); 4BCLIN, P14 e P14A: sorotipo 4b (sangue)..... **121**
- Figura 39.** Porcentagens de células epiteliais HeLa Anexina V⁺, características do processo apoptótico, 24 horas pós-infecção com cepas de *L. monocytogenes*, determinadas por citometria de fluxo. Média de dois experimentos em duplicata. Para letras iguais não há diferença estatística entre as cepas ($p>0,05$). 1/2B: sorotipo 1/2b (alimento); 1/2C: sorotipo 1/2c (ambiente); 4BENV: sorotipo 4b (ambiente); 4BCLIN, P14 e P14A: sorotipo 4b (sangue)..... **123**
- Figura 40.** Porcentagens de células epiteliais HeLa PI⁺, características do processo necrótico, 24 horas pós-infecção com cepas de *L. monocytogenes*, determinadas por citometria de fluxo. Média de dois experimentos em duplicata. Para letras iguais não há diferença estatística entre as cepas ($p>0,05$). 1/2B: sorotipo 1/2b (alimento); 1/2C: sorotipo 1/2c (ambiente); 4BENV: sorotipo 4b (ambiente); 4BCLIN, P14 e P14A: sorotipo 4b (sangue)..... **123**
- Figura 41** Porcentagens de células epiteliais MDBK Anexina V⁺, características do processo apoptótico, 8 horas pós-infecção com cepas de *L. monocytogenes*, determinadas por citometria de fluxo. Média de dois experimentos em duplicata. Para letras iguais não há diferença estatística entre as cepas ($p>0,05$). 1/2B: sorotipo 1/2b (alimento); 1/2C: sorotipo 1/2c (ambiente); 4BENV: sorotipo 4b (ambiente); 4BCLIN, P14 e P14A: sorotipo 4b (sangue)..... **125**

- Figura 42.** Porcentagens de células epiteliais MDBK PI⁺, características do processo necrótico, 8 horas pós-infecção de incubação com cepas de *L. monocytogenes*, determinadas por citometria de fluxo. Média de dois experimentos em duplicata. Para letras iguais não há diferença estatística entre as cepas ($p>0,05$). 1/2B: sorotipo 1/2b (alimento); 1/2C: sorotipo 1/2c (ambiente); 4BENV: sorotipo 4b (ambiente); 4BCLIN, P14 e P14A: sorotipo 4b (sangue)..... **125**
- Figura 43.** Porcentagens de células epiteliais MDBK Anexina V⁺, características do processo apoptótico, 24 horas pós-infecção com cepas de *L. monocytogenes*, determinadas por citometria de fluxo. Média de dois experimentos em duplicata. Para letras iguais não há diferença estatística entre as cepas ($p>0,05$). 1/2B: sorotipo 1/2b (alimento); 1/2C: sorotipo 1/2c (ambiente); 4BENV: sorotipo 4b (ambiente); 4BCLIN, P14 e P14A: sorotipo 4b (sangue)..... **126**
- Figura 44.** Porcentagens de células epiteliais MDBK PI⁺, características do processo apoptótico, 24 horas pós-infecção com cepas de *L. monocytogenes*, determinadas por citometria de fluxo. Média de dois experimentos em duplicata. Para letras iguais não há diferença estatística entre as cepas ($p>0,05$). 1/2B: sorotipo 1/2b (alimento); 1/2C: sorotipo 1/2c (ambiente); 4BENV: sorotipo 4b (ambiente); 4BCLIN, P14 e P14A: sorotipo 4b (sangue)..... **126**
- Figura 45.** Porcentagens de *L. monocytogenes* com filamentos de actina em relação ao número total de bactérias encontradas no citoplasma 2 e 3 horas pós-infecção em células HeLa. Média de dois experimentos em duplicata. Para letras iguais não há diferença estatística entre as cepas ($p>0,05$). 1/2B: sorotipo 1/2b (alimento); 1/2C: sorotipo 1/2c (ambiente); 4BENV: sorotipo 4b (ambiente); 4BCLIN, P14 e P14A: sorotipo 4b (sangue)..... **130**
- Figura 46.** Visualização das cepas de *L. monocytogenes* 1/2C, 4BCLIN e P14A (verde) e filamentos de actina (vermelho) em células eucarióticas HeLa 3 horas pós-infecção. Resultado representativo. 1/2B: sorotipo 1/2b (alimento); 1/2C: sorotipo 1/2c (ambiente); 4BENV: sorotipo 4b (ambiente); 4BCLIN, P14 e P14A: sorotipo 4b (sangue)..... **131**

- Figura 47.** Transcrição gênica dos genes *actA*, *plcA* e *plcB* normalizada pelo gene *housekeeping ldh* 5 horas pós-infecção de células epiteliais HeLa por cepas de *L. monocytogenes*. Média de três experimentos realizados em duplicata. Para letras iguais não há diferença estatística entre as cepas ($p>0,05$). 1/2B: sorotipo 1/2b (alimento); 1/2C: sorotipo 1/2c (ambiente); 4BENV: sorotipo 4b (ambiente); 4BCLIN, P14 e P14A: sorotipo 4b (sangue) para identificação das cepas..... **135**
- Figura 48.** Curvas de crescimento de cepas de *L. monocytogenes* a 37°C, sob agitação de 200 rpm, em um intervalo de 9 horas de incubação. Média de três experimentos em duplicata. 1/2B: sorotipo 1/2b (alimento); 1/2C: sorotipo 1/2c (ambiente); 4BENV: sorotipo 4b (ambiente); 4BCLIN: sorotipo 4b (sangue)..... **167**

INTRODUÇÃO

1. Introdução

1.1. Enfermidades Transmitidas por Alimentos (ETA)

As enfermidades transmitidas por alimentos (ETA) têm sido, nos últimos anos, foco de discussões, havendo grande preocupação e procura, em todo o mundo, por estratégias que permitam o seu controle e, conseqüentemente, a garantia da disponibilização de produtos seguros no mercado.

O aumento exponencial de ETA verificado atualmente em muitos países é influenciado por vários fatores, o que dificulta o controle por parte das autoridades de saúde pública. Os riscos são ainda maiores devido à globalização, que intensificou o comércio entre países desenvolvidos e em desenvolvimento.

Mais de 200 doenças conhecidas são transmitidas por alimentos, com sintomas variando desde uma suave gastroenterite até complicações crônicas, podendo levar à morte (MEAD *et al.*, 1999). Dentro deste quadro, 40 patógenos de origem alimentar já foram caracterizados, sendo as bactérias responsáveis por 90% de casos e surtos segundo relato do Centro de Controle e Prevenção de Doenças dos Estados Unidos - CDC (BEAN *et al.*, 1990).

O impacto das ETA na saúde pública é evidente. Por exemplo, nos Estados Unidos, são estimados cerca de 76 milhões de casos de ETA por ano, levando a 325.000 hospitalizações e 5.000 mortes. Apenas os patógenos *Escherichia coli*, *Listeria* e *Toxoplasma* são responsáveis por 1.500 mortes por ano. As taxas de mortalidade mais elevadas são relacionadas à infecção por *Listeria monocytogenes* (30%), que apresentam índices muito mais elevados que outros patógenos, como *Salmonella Enteritidis* (0,38%), *Campylobacter* (0,02% a 0,1%) e *Vibrio* (0,005% a 0,01%) (ALTEKRUSE *et al.*, 1997; MEAD *et al.*, 1999).

Um estudo realizado na Inglaterra (em 1999) estimou a extensão de casos não notificados e constatou que, para cada caso notificado (detectado em laboratórios oficiais de vigilância), existem mais 136 casos na comunidade (WHEELER *et al.*, 1999).

Quantificações a respeito dos gastos e dos impactos econômicos causados pelas ETA são praticamente inexistentes, mas suficientes para revelar que essas doenças representam um enorme fardo para a economia. Os custos com ETA incluem diminuição na renda pessoal devido à perda de dias de trabalho, custos com cuidados médicos, diminuição de produtividade, custos relacionados à investigação de surtos, fechamento de empresas e diminuição nas vendas, quando consumidores evitam comprar determinados produtos, entre outros.

No Brasil, as informações sobre ETA são mais escassas ainda. Um estudo realizado no Estado do Paraná revelou que no ano de 2000 foram gastos pelo governo cerca de 2 milhões de reais, somente em internações devido às ETA (AMSON *et al.*, 2006).

1.2. *Listeria*, listeriose e sua importância

1.2.1. Histórico

Em 1924, Murray, Webb e Swann relataram o primeiro isolamento de *L. monocytogenes* em coelhos, a qual foi responsável por uma leucocitose mononuclear típica nestes animais, denominando o microrganismo de *Bacterium monocytogenes* (MURRAY *et al.*, 1926). Pirie, em 1930, isolou este microrganismo em roedores e alterou o nome para de *Listerella hepatolytica* em homenagem ao cirurgião britânico, Sir Joseph Lister. A denominação *Listeria monocytogenes* foi definida em 1940 e, em 1948, incluída no Manual Bacteriológico Determinativo de Bergey (BREED *et al.*, 1948).

Até 1961, *L. monocytogenes* era a única espécie reconhecida do gênero *Listeria*, mas atualmente existem seis espécies: *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. seeligeri*, *L. grayi* e *L. ivanovii*. *Listeria* é bacilo curto, gram-positivo, anaeróbio facultativo, não esporulado e não formador de cápsulas. Os bacilos possuem dimensões de 0,4µm a 0,5µm de diâmetro de 0,5µm a 2µm de comprimento e são móveis à temperatura de 25°C devido à presença de flagelos peritríqueos. Este microrganismo pode multiplicar-se em uma ampla faixa de temperatura (1°C – 45°C) e pH (4.3 – 9.6), além de tolerar concentrações salinas altas (RYSER; MARTH, 1999).

L. monocytogenes é um microrganismo ubiqüitário, podendo ser isolado de solos, águas, efluentes, vegetais e alimentos. A doença infecciosa causada por este patógeno é conhecida como listeriose (SEELIGER; JONES, 1986).

Listeriose surgiu como uma importante doença de origem alimentar no início dos anos 1980, sendo responsável por casos de aborto, meningite e septicemia, diagnosticada principalmente em pessoas pertencentes a grupos de risco: imunodeprimidos, idosos, crianças e mulheres grávidas (FARBER; PETERKIN, 1991).

L. monocytogenes é considerado um patógeno oportunista, uma vez que a ocorrência da infecção depende principalmente das condições imunológicas dos indivíduos afetados. Entretanto, em meados dos anos 1990 uma nova forma da doença foi reconhecida, que envolve sintomas gastrointestinais suaves, afetando pessoas saudáveis (DALTON *et al.*, 1997; SALAMINA *et al.*, 1996; SCHLECH, 1997).

1.2.2. Situação atual

O desafio de controlar a presença e disseminação de cepas de *L. monocytogenes* em plantas processadoras de alimento faz parte de diversos programas de saúde pública, principalmente nos Estados Unidos. Todos estes programas têm como meta reduzir os casos de listeriose e melhorar a qualidade de vida da população. Apesar dos avanços já obtidos, a incidência e persistência deste microrganismo ainda são consideradas altas e mundialmente presentes (KORNACKI, 2005).

Como *L. monocytogenes* é um microrganismo ubiqüitário, muito pesquisadores acreditam que a erradicação do microrganismo nas linhas processadoras de alimentos e, conseqüentemente, no produto final, não seja possível, mesmo com as tecnologias atualmente existentes (TOMPKINS *et al.*, 1999).

Apesar da baixa morbidade da doença, a mortalidade associada é elevada, entre 20% a 30%, porém com incidência anual de 2 a 10 casos por milhão de pessoas (MEAD *et al.*, 1999). Pode-se supor que nas próximas décadas ocorra elevação destes números, apesar dos esforços das indústrias e das autoridades, uma vez que indivíduos susceptíveis e grupos vulneráveis tendem a crescer.

Outro fator que pode contribuir para esta elevação é a demanda, por parte dos consumidores, de alimentos processados cada vez mais semelhantes ao produto *in natura* e com vida-de-prateleira mais longa. *L. monocytogenes* tem sido associada tanto a alimentos de origem animal quanto vegetal e os alimentos minimamente processados, que têm sua conservação baseada no armazenamento a baixas temperaturas, são exemplo de produtos de risco. Isto porque *L. monocytogenes* possui grande capacidade de sobreviver, e até se multiplicar, em condições adversas a outros microrganismos, como temperatura de refrigeração.

A ocorrência de listeriose de origem alimentar é relatada principalmente em países industrializados, com poucos, ou nenhum relato, em países em desenvolvimento. Entretanto, não se sabe se isto reflete diferentes taxas de exposição, hábitos alimentares e susceptibilidade do hospedeiro ou se falta de sistemas de pesquisa e informação de dados (FOOD..., 2000). Os alimentos associados com a transmissão da doença são usualmente processados industrialmente, têm vida-de-prateleira longa em temperatura de refrigeração, são capazes de permitir a multiplicação de *L. monocytogenes* e são consumidos sem cocção prévia (ROCOURT *et al.*, 2000).

Diversos trabalhos têm sido realizados para estudar as condições sob as quais *L. monocytogenes* pode sobreviver e/ou se multiplicar em um alimento (BEUCHAT; BRACKETT, 1991; BUNCIC; AVERY, 1996; FARBER *et al.*, 1998; FARBER; DALEY, 1994; LIBERTI *et al.*, 1996; MIDELET *et al.*, 2006), mas pouco tem sido feito para esclarecer como as complexas interações existentes entre os múltiplos parâmetros (físicos, químicos e estruturais) de um alimento podem contribuir para a patogênese deste microrganismo.

L. monocytogenes é responsável por cerca de 2.500 casos de ETA por ano nos Estados Unidos, sendo 500 destes fatais. Somente no ano de 2005 foram registrados 135 casos de listeriose. Apesar deste número ter reduzido em relação aos anos anteriores, ainda não se encontra dentro dos padrões estabelecidos pelo país (ACHIEVING..., 2005). Estima-se que nos EUA o custo anual de casos agudos de listeriose é de cerca de 2,3 bilhões de dólares (UNITED STATES, 2006).

O Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA) estabeleceu política de tolerância zero para os alimentos prontos para consumo em relação à presença de *L. monocytogenes*. Apesar disso, muitos casos de recolhimentos de alimentos contaminados por

esta bactéria ainda causam enormes prejuízos às indústrias alimentares norte-americanas. E surtos continuam ocorrendo.

Entre julho e novembro de 2002 ocorreu nos EUA um surto afetando nove estados daquele país, que, de acordo com dados epidemiológicos, esteve relacionado com o consumo de derivados de aves (peru e frango) prontos para o consumo. Os produtos haviam sido produzidos por uma única empresa, a Pilgrim's Pride Co, que providenciou o recolhimento do mercado de 12.450 toneladas de carnes de aves e de produtos preparados, sendo esta considerada a maior recolha de alimentos do país. O número exato de envolvidos é controverso, mas a versão oficial reporta 54 infectados, oito mortos e três abortos (OUTBREAK..., 2002).

Também no ano de 2002, no Canadá, o consumo de queijos tipo Camembert e Tomme foi responsável por um surto de listeriose que afetou 68 pessoas, resultando em dois óbitos (GAULIN *et al.*, 2003).

Na Europa, entre os anos de 1991 a 2002, ocorreu o total de 19 surtos de listeriose em nove países, perfazendo 526 casos, sendo que os principais alimentos envolvidos foram produtos cárneos, queijos, peixes e um surto com manteiga (HEDBERG, 2006).

Na França, durante os anos de 1992 a 2002, foram identificados oito surtos de listeriose de origem alimentar variada (derivados suínos e queijos), resultando no total de 423 casos. No entanto, a incidência anual de listeriose naquele país vem diminuindo e hoje possui uma das menores taxas da Europa, equiparando-se ao sistema norte-americano (GOULET *et al.*, 2006).

Na Finlândia foram notificados três surtos de listeriose nos anos de 1997, 1999 e 2000, resultando em 40 casos, sendo os alimentos envolvidos: truta defumada, manteiga e peixe,

respectivamente. A incidência nesse país não apresentou queda até o ano de 2004, data do último estudo epidemiológico realizado (LYYTIKAINEN *et al.*, 2006).

Em 2003, no Reino Unido, ocorreu um surto de listeriose devido à ingestão de sanduíches prontos para consumo contaminados, afetando cinco mulheres grávidas. Este fato levou ao fechamento da indústria, até que esta realizasse modificações em suas instalações de acordo com a legislação britânica (DAWSON *et al.*, 2006).

Durante o ano de 2005, dez casos de listeriose foram notificados na Suíça, sendo oito destes relacionados a pessoas idosas, resultando em três mortes, e dois casos em mulheres grávidas, levando ao aborto. Os estudos epidemiológicos identificaram o queijo Tomme como responsável pelo surto (BILLE *et al.*, 2006).

Também foram notificados quatro surtos de gastroenterites agudas por *L.monocytogenes* no continente europeu: dois surtos na Itália, em 1993 (18 casos) e em 1997 (1566 casos), devido à salada de arroz e à de milho, respectivamente; um surto na Dinamarca, em 1996 (3 casos), no qual o alimento envolvido não foi identificado; e um surto na Bélgica, em 2001 (3 casos), por sorvete contaminado (HEDBERG, 2006).

No Brasil, os surtos e/ou casos de listeriose são subnotificados e subdiagnosticados, porém alguns pesquisadores realizaram estudos em relação à prevalência e característica de cepas de *L. monocytogenes* isoladas de pacientes no país, mas sem estabelecer algum tipo relação com a via de transmissão alimentar.

Hofer *et al.* (1998) e Landgraf *et al.* (1999) isolaram cepas de *L. monocytogenes* de indivíduos pertencentes ao grupo de risco que apresentavam quadro de meningite, sendo que alguns destes pacientes faleceram. A fonte de transmissão não foi determinada.

Apesar de diversas formas de transmissão do microrganismo a humanos já terem sido relatadas, a via alimentar parece ser a mais importante. Nos casos epidêmicos, as cepas isoladas dos alimentos implicados e dos pacientes apresentaram as mesmas características (sorotipo, fagotipo, perfil de restrição enzimática), o que reforça a importância do alimento na epidemiologia de listeriose.

A sorotipagem de *L. monocytogenes* é importante para a caracterização e correlação entre os isolados envolvidos em surtos. Esta metodologia baseia-se na variação dos antígenos somáticos (O) e flagelares (H) presentes na bactéria. Já foram identificadas 13 sorovariedades de *L. monocytogenes* capazes de causar doença, 90% dos casos de listeriose humanos são causados pelos sorotipos 1/2a, 1/2b e 4b, sendo este último responsável pela maioria (50%) (MCLAUCHLIN, 1990). Em contraposição, os sorotipos 1/2a, 1/2b e 1/2c predominam em amostras de alimentos (AUTIO *et al.*, 1999; GILOT *et al.*, 1996; OJENIYI *et al.*, 1996; ROCOURT *et al.*, 1989).

Hofer *et al.* (1998) isolaram *L. monocytogenes* pertencentes aos sorotipos 1/2a e 4b de três pacientes que apresentavam quadro clínico de meningite. Os indivíduos pertenciam ao grupo de risco: um bebê com dez dias de vida, uma criança com oito anos de idade e uma mulher portadora de lúpus eritematoso sistêmico.

Landgraf *et al.* (1999) isolaram *L. monocytogenes* (sorotipo 4b) do líquido cefalorraquidiano (LCR) de cinco crianças recém-nascidas em um hospital da Grande São Paulo, sendo que três crianças faleceram.

Em um trabalho mais recente, Hofer *et al.* (2006) analisaram fenotipicamente 255 cepas de *L. monocytogenes* isoladas de amostras clínicas no período de 1969 a 2000. As amostras foram obtidas em diferentes regiões do Brasil e de indivíduos de diversas faixas etárias. O microrganismo somente foi isolado em amostras de sangue. Na distribuição geográfica dos

isolados houve predominância de *L. monocytogenes* nas regiões Sul e Sudeste (89,1%), embora também tenha sido detectada em estados do Centro-Oeste e Nordeste (10,9%). Em relação aos sorotipos, o 4b foi o mais freqüente, seguido de 1/2a em todo o país, com exceção do Estado da Bahia, onde se isolou somente o sorotipo 1/2a.

Uma análise de sorotipos de *L. monocytogenes* isolados de 1.363 pacientes indicou que o sorotipo 4b foi o mais comum, estando presente em 64% dos casos, enquanto os sorotipos 1/2a, 1/2b e 1/2c foram detectados em 15%, 10% e 4%, respectivamente. O sorotipo 4b foi mais comum em casos associados à gravidez e o sorotipo 1/2b em indivíduos imunodeficientes (MCLAUHLIN, 1990).

Wiedmann *et al.* (1997) propuseram o agrupamento de cepas de *L. monocytogenes* em 3 linhagens distintas, sendo que a linhagem I inclui os sorotipos 1/2b, 3b, 4b, 4d e 4e, a linhagem II, 1/2a, 1/2c, 3a e 3c e a linhagem III, 4a e 4c. Esta divisão foi baseada em características obtidas com ribotipagem e análise por RFLP dos genes de virulência *hly*, *inlA* e *actA*, combinadas com a origem dos isolados (humano ou animal) e seus sorotipos. A linhagem I agrupou as cepas envolvidas em surtos de listeriose.

Gilbreth *et al.* (2005) testaram 544 isolados de *L. monocytogenes*, incluindo amostras de alimentos e amostras clínicas, observando a prevalência de cepas pertencentes ao sorogrupo 1 nos isolados de alimentos e sorotipos 1/2a e 4b nos isolados clínicos. Com a técnica de PFGE pode-se verificar que existem populações distintas e heterogeneidade entre os isolados alimentares e clínicos, e que as cepas pertencentes ao sorotipo 4b mostraram variabilidade genética superior ao sorotipo 1/2a. Foi avaliado também que as cepas de *L. monocytogenes* pertencentes às linhagens I e II são recuperadas de maneiras distintas, dependendo do meio de cultura utilizado para o isolamento das mesmas.

Os sistemas de vigilância atuantes consideram todas as cepas de *L. monocytogenes* igualmente patogênicas, já que faltam marcadores fenotípicos e/ou genotípicos para determinação da virulência. No entanto, diversos estudos de imunodeterminantes superficiais (JACQUET *et al.*, 2002; TABOURET *et al.*, 1992) e modelos de infecção em animais experimentais (LARSEN *et al.*, 2002; OLIER *et al.*, 2002; ROCHE *et al.*, 2001) sugerem que a virulência de *L. monocytogenes* seja heterogênea.

Estudos demonstram que alterações fisiológicas podem ser induzidas em cepas de *L. monocytogenes* como resposta a mudanças ambientais e que estas podem resultar numa pré-adaptação do microrganismo ao hospedeiro, tornando-o mais capaz de causar infecção (BUNCIC *et al.*, 2001; CZUPRYNSKI *et al.*, 1989; MCKELLAR, 1993; MYERS *et al.*, 1993; STEPHENS *et al.*, 1991).

Sabe-se que o gene *gtcA*, cuja função está relacionada à glicosilação dos ácidos teicóicos presentes na membrana celular da bactéria, encontra-se presente somente em cepas de *L. monocytogenes* pertencentes ao sorotipo 4b (PROMADEJ *et al.*, 1999). Em um recente estudo realizado com cepas de *L. monocytogenes* Δ *gtcA* demonstrou-se que estas apresentam virulência reduzida tanto em experimentos realizados com camundongos, como em culturas celulares Caco-2. Em ambos os casos a taxa de invasão e proliferação apresentou-se diminuída em relação à cepa selvagem, porém, em macrófagos J774 esta diferença não foi observada (KATHARIOU, 2007).

1.3. Determinantes moleculares de virulência e mecanismo de regulação

Dentre os fatores de virulência necessários para o parasitismo intracelular de *L. monocytogenes*, seis proteínas são codificadas por genes localizados em um locus de 9kb, denominado de região central de virulência (*prfA*, *plcA*, *hly*, *mpl*, *actA* e *plcB*), também referida como LIPI-1 (Ilha de Patogenicidade de *Listeria* 1) (VAZQUEZ-BOLAND *et al.*,

2001b) (Figura 1). Este cluster está organizado por *monocistron hly*, que codifica a hemolisina. O gene *hly* está rodeado por dois óperons associados à virulência, o óperon de lecitinase, que contém os genes *mpl*, *actA* e *plcB*, e, no outro extremo, o óperon *plcA-prfA*, que é transcrito na orientação oposta (KREFT; VAZQUEZ-BOLAND, 2001; LAMPIDIS *et al.*, 1994; VAZQUEZ-BOLAND *et al.*, 2001b).

Já se identificou que a maioria dos fatores de virulência é regulada pelo Fator Regulador Positivo (PrfA) (PORTNOY *et al.*, 1992). PrfA é o regulador central de virulência de *L. monocytogenes* e ativa a expressão dos genes de LIPI-1 e de alguns outros genes de virulência, incluindo membros da família das internalinas (*inlA* e *inlB*) (Figura 1). Os promotores dos genes regulados por PrfA apresentam seqüências palindrômicas de 14pb, denominadas *box* PrfA, localizadas 41pb acima do início da transcrição. PrfA está estruturalmente e funcionalmente relacionado com Crp (Proteína Receptora de cAMP) das enterobactérias e é o único gene regulador de virulência descrito até o momento em *Listeria* (KREFT *et al.*, 1995; LAMPIDIS *et al.*, 1994).

Estudos têm demonstrado que, na natureza, o sistema PrfA está inativo, mas uma vez dentro do citoplasma, ocorre a ativação deste, levando à transcrição dos genes PrfA-dependentes. Vários fatores contribuem para essa alteração, sendo foco de estudo de algumas pesquisas. *L. monocytogenes* tem a capacidade de somente colocar o seu “maquinário” em ação quando chega o momento de estabelecer o ciclo de infecção a um determinado hospedeiro. A esta transição de “comportamentos” denominou-se de “Mecanismo de transformação do ambiental Dr. Jekyll para o patogênico Senhor Hyde” (GRAY *et al.*, 2006).

A regulação da expressão do próprio *prfA* é muito complexa e envolve múltiplos transcritos de RNAm, mecanismos de retroalimentação (*feedback*) estimulatórios ou

inibitórios, regulação pós-transcricional e uma interação inespecífica com cofatores de baixo peso molecular (DICKNEITE *et al.*, 1998; KUHN; GOEBEL, 1995).

Os níveis basais de expressão de *prfA* e, portanto, de todos os fatores PrfA-dependentes diferem entre as espécies do gênero *Listeria*. Em *L. monocytogenes* uma variedade de sinais dependentes da fase de crescimento e do meio ambiente modulam a expressão deste regulador de virulência por intermédio desta proteína. Estes sinais ativadores incluem temperaturas, condições de estresse, seqüestro de componentes químicos do meio extracelular, contato com células eucarióticas, além do ambiente citoplasmático da célula hospedeira. O modelo atualmente aceito do mecanismo de regulação de PrfA sugere um intercâmbio alostérico mediado por um cofator de baixo peso molecular, dependente de condições ambientais, mas que ainda não foi identificado. A ativação de *prfA* resulta na síntese de mais proteína PrfA que, por meio de um sistema de retroalimentação positiva mediada por um promotor PrfA-dependente, direciona a síntese de RNAm. (BREHM *et al.*, 1996; ENGELBRECHT *et al.*, 1998; KREFT *et al.*, 1995; RIPIO *et al.*, 1996; VEGA *et al.*, 1998).

Figura 1. Representação esquemática da organização e controle de regulação de alguns genes de virulência de *L. monocytogenes* (fonte: adaptado de Milohanic *et al.*, 2003).

Chico-Calero *et al.* (2002) verificaram que quando o ambiente está favorável ao desenvolvimento da bactéria, esta utiliza as fontes de carbono convencionais, como glicose, frutose e manose, o que automaticamente leva à inibição da produção do fator PrfA e à conseqüente diminuição da expressão dos fatores de virulência. Estas condições são observadas em experimentos *in vitro* em meio de cultura. Já quando o ambiente está inóspito, como no interior da célula de mamíferos, o microrganismo tem a capacidade de utilizar, como fonte de energia, hexoses fosfatadas, o que contribui para a proliferação de *L. monocytogenes*. Este metabolismo alternativo não causa repressão do *prfA*.

Milohanic *et al.* (2003) analisaram a regulação do sistema PrfA baseado no genoma previamente descrito da cepa de *L. monocytogenes* EGD. Neste estudo verificaram que o fator PrfA tanto pode ativar como reprimir genes, dependendo de fatores extrínsecos, como a presença de carvão ativado e de alguns carboidratos. Os genes regulados pelo PrfA foram divididos em três grupos, sendo que no grupo I encontram-se os genes de virulência de função já conhecida e que são transcritos na presença de carvão ativado e inibidos pela presença de celobiose. O grupo II inclui genes de virulência que ainda não possuem função definida, porém apresentam-se reprimidos pelo PrfA em todas as condições estudadas. Já o grupo III engloba o maior número de genes, porém, cujas funções ainda são desconhecidas, mas demonstram ativação pelo PrfA na presença de celobiose, porém não na de carvão ativado.

Na literatura foi descrita uma cepa mutante de *L. monocytogenes* denominada P14A que, devido a uma mutação pontual em *prfA* (substituição Gli-145-Ser), superexpressa constitutivamente todos os fatores de virulência PrfA-dependentes (RIPIO *et al.*, 1997a). A cepa P14A é um derivado isogênico *prfA** de P14, cepa isolada de um caso de listeriose (VAZQUEZ-BOLAND *et al.*, 1991).

1.4. Ciclo Intracelular de Infecção

L. monocytogenes é considerado um parasita intracelular facultativo e que pode se proliferar dentro de macrófagos e em outras células não fagocíticas profissionais, como células epiteliais e hepatócitos. Este microrganismo tem a capacidade de evitar a resposta do sistema imune humoral, por se multiplicar dentro da célula hospedeira, e escapar da resposta imune celular, por disseminar-se através da passagem célula-célula (VAZQUEZ-BOLAND *et al.*, 2001a).

Em todas essas células *L. monocytogenes* desenvolve um ciclo celular semelhante que pode ser dividido em três etapas: escape do fagossomo após a fagocitose, multiplicação dentro da célula hospedeira e invasão da célula vizinha. A invasão é decorrente da polimerização de filamentos de actina que "empurram" a bactéria em direção à célula adjacente, provocando a formação de invaginações e fagocitose, recomeçando assim, um novo ciclo (SHEEHAN *et al.*, 1994) (Figura 2).

1.4.1. Internalização e colonização

Sendo os alimentos contaminados a maior fonte de transmissão tanto para os surtos como para os casos esporádicos de listeriose, o trato gastrointestinal (TGI) é o principal foco de colonização e entrada do patógeno, uma vez dentro hospedeiro. A fim de colonizar o TGI, o microrganismo deve sobreviver às condições adversas, como a acidez estomacal, a alta osmolaridade e a presença de sais biliares no intestino delgado (COBB *et al.*, 1996). Vários fatores influenciam o sucesso da colonização por *L. monocytogenes* no hospedeiro: presença de células *natural killers* e linfócitos T do sistema imune intestinal, integridade do epitélio intestinal, carga microbiana presente no alimento contaminado e grau de virulência das cepas (JACQUET *et al.*, 2004; OKAMOTO *et al.*, 1994).

Figura 2. Ciclo de vida intracelular de *L. monocytogenes* (fonte: adaptado de Tilney; Portnoy, 1989).

A partir do TGI, *L. monocytogenes* pode ser responsável por duas formas clínicas de listeriose: infecção não invasiva limitada ao intestino ou infecção invasiva localizada ou sistêmica (ROBERTS; WIEDMANN, 2003).

A translocação intestinal do patógeno leva à invasão do epitélio intestinal e à colonização de tecidos mais profundos, com posterior disseminação via corrente sanguínea ou linfonodos em direção a órgãos alvos, como baço e fígado (PRON *et al.*, 1998).

L. monocytogenes internaliza-se tanto através da superfície basolateral de células epiteliais intestinais, como demonstrado em estudos *in vitro* com células eucarióticas Caco-2 (KARUNASAGAR *et al.*, 1994), mas também pode colonizar as placas de Peyer, através de invasão pelas células M, como demonstrado em experimentos *in vivo* com camundongos (MARCO *et al.*, 1992).

O ciclo de infecção por *L. monocytogenes* inicia-se com a adesão da bactéria à superfície da célula eucariótica e posterior entrada na mesma através de fagocitose ou, no caso de células não-fagocíticas, pela interação entre moléculas ligantes e receptores. A invasão ocorre por um mecanismo conhecido como “zíper” no qual a bactéria progressivamente vai penetrando na célula até que seja totalmente internalizada (FINLAY *et al.*, 1991; IRETON; COSSART, 1998). Durante este processo, a membrana da célula eucariótica vai envolvendo a bactéria, provocando alterações leves no citoesqueleto. Este processo difere daquele de outros patógenos intestinais, tais como *Shigella flexneri* e *Salmonella typhimurium*, que promovem sua entrada através da inserção de sistema de secreção (ISBERG; TRAN VAN NHIEU, 1994; MENGAUD *et al.*, 1996; SWANSON; BAER, 1995).

Estudos indicam que *L. monocytogenes* pode reconhecer receptores diferentes das células eucarióticas, incluindo glicoproteínas transmembrânicas como E-caderina (células epiteliais), receptor de molécula complemento (C1q), receptor de fator de crescimento de hepatócitos (Met), além de componentes da matriz extracelular, como as proteoglicanas (BRAUN *et al.*, 1998; COSSART, 2001; DRAMSI *et al.*, 1995; GAILLARD *et al.*, 1991; PARIDA *et al.*, 1998; SHEN *et al.*, 2000). Os ligantes das bactérias são principalmente as internalinas A e B (InlA e InlB), codificadas pelos genes *inlA* e *inlB*, respectivamente, que são proteínas de superfície caracterizadas por possuir repetições ricas em leucina (LRR), responsáveis por intermediar a ligação proteína-proteína (Figura 3). Outras proteínas de superfície, como autolisinas (ami, p60 e auto), podem estar envolvidas no processo de invasão, porém atuando como adesinas (CABANES *et al.*, 2004; HESS *et al.*, 1995).

A proteína InlA apresenta uma interação específica com a proteína E-caderina, o que limita a sua ligação a algumas células epiteliais como, por exemplo, Caco-2. Já a InlB está envolvida na entrada de *L. monocytogenes* em hepatócitos e outras células não-epiteliais. As

principais proteínas receptoras do hospedeiro que interagem com InlB são: C1q e Met (BRAUN *et al.*, 2000; SHEN *et al.*, 2000) (Figura 3).

Alguns estudos também indicaram que a proteína polimerizadora de actina (ActA) possa participar no processo de invasão, provavelmente via algum componente da matriz extracelular, como proteoglicanas. Esta propriedade foi demonstrada por meio da construção de mutantes $\Delta inlAB$ de cepas de *L. monocytogenes* que ainda assim apresentaram capacidade invasiva em experimentos *in vitro* e *in vivo* (ALVAREZ-DOMINGUEZ *et al.*, 1997; DOMANN *et al.*, 1992; DRAMSI *et al.*, 1995; DREVETS *et al.*, 1995; OGAILLARD *et al.*, 1996; GREGORY *et al.*, 1996; GREIFFENBERG *et al.*, 1998; LINGNAU *et al.*, 1995; MENGAUD *et al.*, 1996; SCHLUTER *et al.*, 1998; SUAREZ *et al.*, 2001).

Figura 3. Representação gráfica das estratégias de invasão celular de *L. monocytogenes* (fonte: adaptado de Pizarro-Cerda; Cossart, 2006).

1.4.2. Escape do fagossomo primário

Após a invasão, a bactéria encontra-se em um fagossomo que se acidifica rapidamente (BEAUREGARD *et al.*, 1997). Há evidências que *L. monocytogenes* impede a fusão do fagossomo com lisossomo para poder estabelecer seu ciclo de infecção (ALVAREZ-DOMINGUEZ *et al.*, 1997). Logo após 30 minutos de invasão, a bactéria inicia o processo de ruptura desta membrana fagossômica, sendo que em 2 horas 50% da população bacteriana encontra-se livre no citoplasma (GAILLARD *et al.*, 1987; GOEBEL; KREFT, 1997). Esta etapa é essencial para a sobrevivência e proliferação do microrganismo, sendo mediada por uma hemolisina (Hly) juntamente com fosfolipases. Sabe-se que em determinados tipos celulares a presença da hemolisina é fundamental para o ciclo de infecção de *L. monocytogenes*, como em macrófagos murino J774; já em células HenLe e HeLa as fosfolipases conseguem, por si só, romper as membranas dos fagossomos permitindo a multiplicação do microrganismo (PORTNOY *et al.*, 1988; SMITH *et al.*, 1995).

O gene da hemolisina (*hly*) foi o primeiro fator de virulência de *L. monocytogenes* a ser identificado e sequenciado. A hemolisina produzida pertence à família das toxinas colesterol-dependente formadoras de poro (CDTX), sendo ativa somente em pH baixo (5,5). Por esta característica, a hemolisina não é atuante no compartimento citoplasmático, conservando a célula hospedeira intacta para o ciclo intracelular de *L. monocytogenes* (KREFT *et al.*, 1989; VAZQUEZ-BOLAND *et al.*, 1989). Esta proteína também possui em sua estrutura uma sequência PEST (prolina, glutamina, serina, treonina) que, quando reconhecida pela célula eucariótica, inicia o processo de formação de poros na parede celular do hospedeiro (DECATUR; PORTNOY, 2000; LETY *et al.*, 2001). Os poros ou lesões na membrana do fagossomo (causados por Hly) provavelmente facilitam o acesso das fosfolipases aos seus substratos, levando à total ruptura da barreira física que delimita o compartimento

fagossomal. Cepas mutantes Δhly são avirulentas em modelos murinos (HAAS *et al.*, 1992; KREFT *et al.*, 1989; MENGAUD *et al.*, 1988).

As fosfolipases produzidas por *L. monocytogenes* de ação conhecida são fosfolipase A (PlcA), que é específica para o fosfatidilinositol (GOLDFINE; KNOB, 1992), e fosfolipase B (PlcB), que atua em amplo espectro de substratos (fosfatidilserina, fosfatidilcolina, fosfatidiletilonamina e esfingomielina) (GOLDFINE *et al.*, 1993).

A produção de PlcB se evidencia facilmente por um halo de opacidade ao redor das colônias bacterianas em placas de ágar com gema de ovo; portanto, pode-se utilizar esta atividade em cepas de *L. monocytogenes* (assim como atividade hemolítica em ágar sangue) para a caracterização fenotípica das cepas (BREHM *et al.*, 1999; RIPIO *et al.*, 1997a). PlcB é secretada pela bactéria em forma de proenzima inativa, que requer sua maturação citoplasmática pela clivagem proteolítica (GEOFFROY *et al.*, 1991; NIEBUHR *et al.*, 1993; RAVENEAU *et al.*, 1992). Esta clivagem é mediada por uma metaloprotease, codificada pelo gene *mpl* (VÁZQUEZ-BOLAND *et al.*, 1992). Apesar desta característica, experimentos realizados com cepas mutantes de *L. monocytogenes* Δmpl mostram que a enzima pré-plcB também pode ser ativada via *mpl*-independente, mas o mecanismo pelo qual ocorre esta ativação ainda não está claro (MARQUIS *et al.*, 1997).

1.4.3. Multiplicação citoplasmática

Uma vez dentro do citoplasma, as bactérias se multiplicam com um tempo de geração de aproximadamente 1 hora (GAILLARD *et al.*, 1987; PORTNOY *et al.*, 1988). Pouco se sabe a respeito dos fatores de virulência implicados nesta fase de replicação citoplasmática. Em *L. monocytogenes*, a multiplicação intracelular não depende da indução de genes de proteínas de estresse, como ocorre com outros patógenos intracelulares, o que indica que o compartimento celular é permissivo à proliferação bacteriana (HANAWA *et al.*, 1995).

Foi identificado e caracterizado o primeiro fator de virulência implicado especificamente na etapa de proliferação intracelular. Esta proteína, codificada pelo gene *hpt*, é responsável pelo transporte de hexoses fosfatadas. Mutantes de *L. monocytogenes* Δhpt apresentaram deficiência em sua capacidade de replicação intracelular e conseqüente redução em sua virulência (CHICO-CALERO *et al.*, 2002).

1.4.4. Movimentação intra e intercelular

As bactérias intracitoplasmáticas são imediatamente envolvidas por uma camada de filamentos de actina após escaparem do fagossomo, que posteriormente são reorganizados em um dos pólos do microrganismo, formando caudas que atingem até 40 μ m de longitude. Esta reorganização é codificada por um único gene, *actA*, responsável pelo movimento inter e intracelular da bactéria. Isto propicia a movimentação de *L. monocytogenes* pelo citoplasma na velocidade de 0,3 μ m/s (DOMANN *et al.*, 1992; KOCKS *et al.*, 1992; VAZQUEZ-BOLAND *et al.*, 1992).

O movimento de *L. monocytogenes* é aleatório e, em algum momento, a bactéria chega a alcançar o limite da periferia celular. Em contato com a membrana celular, empurra-a ao exterior dando lugar a uma protrusão similar a um pseudópode, que alguns autores denominaram de listeriópode. Esta estrutura penetra na célula vizinha e é englobada por fagocitose, resultando na formação de um fagossomo de dupla membrana contendo a bactéria (BECKERLE, 1998; CHAKRABORTY, 1996; COSSART, 1995; DRAMSI; COSSART, 1998; LASA *et al.*, 1998; MACHESKY; GOULD, 1999; SMITH; PORTNOY, 1997).

Além da polimerização dos filamentos de actina há indicações de que possa ocorrer a formação de um complexo de microtúbulos que atuaria junto aos filamentos de actina para facilitar a disseminação e a movimentação de *L. monocytogenes* dentro de células hospedeiras

(SHEEHAN *et al.*, 1994). Pouco se sabe sobre a atuação destes microtúbulos; entretanto, para a disseminação dentro de hepatócitos estes parecem ser fundamentais (BUCHWALOW *et al.*, 1997).

1.4.5. Escape do fagossomo secundário

Após 5 minutos da formação do fagossomo de dupla membrana, a bactéria escapa para o espaço citoplasmático, onde inicia um novo ciclo de proliferação intracelular e de passagem célula-célula (DABIRI *et al.*, 1990; MOUNIER *et al.*, 1990; ROBBINS *et al.*, 1999; SECHI *et al.*, 1997; THERIOT *et al.*, 1992; THERIOT, 1995; TILNEY; PORTNOY, 1989; TILNEY; TILNEY, 1993). O escape do fagossomo de dupla membrana é dependente da atuação da Hly em conjunto com PlcB, produzidas por *L. monocytogenes* (GEDDE *et al.*, 2000).

Desta maneira, *L. monocytogenes* dissemina-se pelos linfonodos e pela corrente sanguínea atingindo, principalmente o fígado e o baço. *L. monocytogenes* também têm a capacidade de atravessar a barreira hemato-encefálica e placentária causando meningite e aborto, respectivamente.

1.5. Diversidade na virulência entre cepas de *L. monocytogenes*

Apesar da abundância de *L. monocytogenes* no ambiente, poucas pessoas ficam seriamente doentes. Sabe-se também que alguns destes microrganismos isolados de amostras de alimentos e do ambiente são avirulentos ou fracamente virulentos e que somente alguns sorotipos são responsáveis pelas infecções sérias que ocorrem. De acordo com diferentes estudos, a porcentagem de cepas de *L. monocytogenes* não virulentas varia de 1,6% a 90% (BROSCH *et al.*, 1993; DEL CORRAL *et al.*, 1990; FARBER *et al.*, 1991; FARBER *et al.*, 1996).

A virulência de cepas de *L. monocytogenes* pode ser avaliada de acordo com a citotoxicidade do patógeno, uma vez dentro do hospedeiro. Sabe-se que as bactérias mais citotóxicas são eliminadas rapidamente do tecido do hospedeiro (por provocar uma resposta imune mais rápida), enquanto aquelas que causam danos limitados às células do hospedeiro podem persistir por mais tempo no organismo, tendo maiores chances de atingir órgãos secundários e causar listeriose (GLOMSKI *et al.*, 2003).

A grande maioria dos estudos de patogenicidade de *L. monocytogenes* é realizada com as cepas cujo genoma já foi descrito, como a cepa EGD, ou cepas de coleções de cultura, como NCTC 7973. Em um trabalho realizado por Behari e Youngman (1998), a cepa NCTC 7973 apresentou um comportamento anômalo quando se avaliou a expressão de *hly* na presença de carboidratos repressores. Foi verificado que esta cepa apresenta duas mutações no *prfA*. Portanto, torna-se importante a pesquisa das propriedades patogênicas de *L. monocytogenes* em cepas recentemente isoladas e que ainda não sofreram nenhum tipo de mutação decorrente de múltiplas passagens em meios de cultura para sua manutenção nos laboratórios.

Ainda não se conseguiu estabelecer as diferenças significativas entre a virulência de cepas associadas aos grandes surtos e aquelas que não estão associadas com doenças de origem alimentar. Os mecanismos básicos responsáveis por esta diferença que permitem que as cepas pertencentes ao sorotipo 4b sejam mais freqüentemente isoladas nos casos de listeriose ainda precisam ser identificados. Acredita-se que estas diferenças estejam mais relacionadas a um processo transcricional ou pós-transcricional, do que à presença ou ausência de determinados genes (BIERNE, 2007).

Com o passar dos anos, diversos modelos têm sido adotados para estudar os mecanismos de virulência de patógenos intracelulares. Apesar de ensaios em meio de cultura terem sido utilizados para caracterizar a virulência, pela simplicidade de realização e rapidez de

resultados, eles não são os melhores para se compreender o mecanismo de virulência de *L. monocytogenes* quando comparados a modelos animais e/ou linhagens celulares.

Contudo, cabe ressaltar que o uso de animais de laboratório implica em algumas condições (éticas e operacionais) que nem sempre estão sob o controle do pesquisador.

Além disso, como demonstrado por Lecuit *et al.* (1999), apenas uma mutação de ponto no receptor E-caderina de camundongos, impede a adesão de *L. monocytogenes* à superfície celular.

Atualmente, tem-se utilizado em experimentos *in vivo* o porquinho-da-índia (*guinea pig*) e camundongos transgênicos, nos quais a molécula de E-caderina interage com InlA, tornando-se, desta forma, um modelo apropriado para o estudo da infecção por *L. monocytogenes*. Porém, neste caso, para realizar-se a infecção intragástrica dos animais é necessário um inóculo muito alto (10^9 UFC/mL) (LECUIT *et al.*, 2001; LECUIT; COSSART, 2002).

A linhagem de camundongo A/J tem sido bastante utilizada também, pois estes animais são susceptíveis à infecção por *L. monocytogenes*, com o mesmo inóculo encontrado nos alimentos, ainda que apresentando a mutação do receptor E-caderina, e desenvolvendo, desta forma, uma infecção sistêmica (CZUPRYNSKI *et al.*, 2003).

Em um estudo desenvolvido por Kim *et al.* (2004) foi possível diferenciar cepas de *L. monocytogenes* epidêmicas das cepas ambientais, pela capacidade invasiva observada no fígado e baço de camundongos A/J intragastricamente inoculados.

Ainda assim, as linhagens de células eucarióticas têm sido vastamente empregadas com a finalidade de auxiliar a compreensão do comportamento de microrganismos, incluindo *L. monocytogenes* (DEL CORRAL *et al.*, 1990; PINE *et al.*, 1991; SCHLECH *et al.*, 1994). Com este modelo pode-se avaliar a capacidade de invasão e a multiplicação

intracitoplasmática, a citopatogenicidade e ainda quantificar a expressão gênica de fatores de virulência, se complementado com estudo *in vivo*, quando necessário.

Para ensaios realizados *in vivo* existe uma relação direta entre capacidade de invasão e sucesso do ciclo de infecção de *L. monocytogenes*, podendo se correlacionar esse fator à maior ou menor virulência. Esta relação sugere que inóculos bacterianos elevados aumentariam as chances de algum microrganismo escapar do sistema imunológico, invadindo os tecidos vizinhos e estabelecendo o quadro infeccioso (TAKEUCHI *et al.*, 2006). Pode-se supor o mesmo para ensaios *in vitro*, definindo, desta forma, cepas de maior invasividade como possíveis causadoras da infecção.

Um dos estudos pioneiros com linhagens de células eucarióticas foi realizado por Farber e Speirs (1987), avaliando o potencial da utilização das mesmas para distinguir cepas patogênicas e não patogênicas pertencentes ao gênero *Listeria*. Foram testadas oito diferentes linhagens: CHO (ovário de hamster chinês), HeLa, Vero (rim de macaco), 293 (rim de embrião humano), K562 (eritroleucemia humana), MA104 (rim de embrião de macaco Rhesus), B79 (plasmactima) e T51B (fígado de rato), e os resultados obtidos mostraram que todas as linhagens foram sensíveis para as cepas de *L. monocytogenes* e não foram afetadas pelas cepas de *L. innocua*.

Um modelo de infecção com células epiteliais intestinais (Caco-2) foi desenvolvido por Gaillard *et al.* (1987). Nesse estudo pôde-se avaliar o mecanismo de invasão e proliferação de *L. monocytogenes* em células não fagocíticas e compreender melhor o ciclo de infecção do microrganismo. Uma limitação para o uso desta linhagem foi demonstrada em uma pesquisa recente, na qual cerca de 40% das cepas de *L. monocytogenes*, provenientes de alimentos, apresentam um códon terminal prematuro, levando à não formação completa da proteína InlA

e ao conseqüente impedimento do ancoramento com a proteína de superfície das células eucarióticas (JACQUET *et al.*, 2004).

Com o uso de linhagens celulares demonstrou-se que *L. monocytogenes* induz apoptose em hepatócitos, linfócitos, células epiteliais Caco-2 e células dendríticas, em decorrência da ação de Hly na mitocôndria ou no retículo endoplasmático da célula hospedeira (GUZMAN *et al.*, 1996; ROGERS *et al.*, 1996; VALENTI *et al.*, 1999). Por outro lado, *L. monocytogenes* não tem a capacidade de causar apoptose em macrófagos murinos (BARSIG; KAUFMANN, 1997). Pouco se sabe a respeito dos mecanismos envolvidos no processo apoptótico de *L. monocytogenes*.

Apoptose tem sido implicada em mecanismos de patogênese bacteriana e envolve uma variedade de interações patógeno-hospedeiro (ROTSTEIN *et al.*, 2000; VAUX; KORKSMEYER, 1999; ZYCHLINSKY; SANSONETTI, 1997). A modulação de apoptose é uma estratégia amplamente utilizada por bactérias extras e intracelulares, mas os mecanismos exatos que levam a essa morte celular programada ainda estão pouco esclarecidos (NEUMEISTER *et al.*, 2002).

Em bactérias do gênero *Legionella* foi observado que algumas espécies induzem apoptose em linhagem monocítica humana. O nível de apoptose variou com a dose e a virulência dos isolados, sendo ativada pela adesão direta da bactéria à superfície celular e não pela sua multiplicação intracelular (NEUMEISTER *et al.*, 2002; WALZ *et al.*, 2000). Outros patógenos bacterianos, como *Shigella flexneri* e *Yersinia* sp, precisam ser internalizados para causar apoptose (SUPERTI *et al.*, 2005; ZYCHLINSKY; SANSONETTI, 1997). Muitos patógenos possuem proteínas de superfície ou secretam metabólitos capazes de funcionar como importantes indutores de apoptose na célula do hospedeiro, como *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* (HASLINGER-LOFFLER *et al.*, 2005; JONES *et al.*, 2000).

Outros patógenos intracelulares possuem um mecanismo para evitar a apoptose e assegurar o maior tempo possível dentro do compartimento citoplasmático. Este é o caso de *Mycobacterium leprae*, que é capaz de levar à repressão dos fatores pro-apoptóticos e indução de fatores anti-apoptóticos em monócitos THP-1 (HASAN *et al.*, 2006).

O ensaio de formação de placas tem sido extensivamente usado para caracterizar a citopatogenicidade de *L. monocytogenes* em diversos tipos celulares, incluindo enterócitos humanos, como Caco-2, fibroblastos murino L2 e L929 e células humanas epiteliais HeLa. Como *L. monocytogenes* tem a capacidade de passagem célula-célula, as placas são formadas na monocamada de células e estas podem ser enumeradas e medidas, sendo essas características correlacionadas com a virulência.

Pine *et al.* (1991) realizaram o ensaio de formação de placas de lise infectando células Caco-2 com diferentes cepas de *L. monocytogenes*. Com os dados obtidos foi possível distinguir entre cepas virulentas e avirulentas, encontrando-se resultados relevantes quando comparados aos obtidos em modelo *in vivo*. Outros trabalhos têm demonstrado que seus resultados apresentam correlação satisfatória com ensaios em modelos animais na investigação da patogenicidade e da letalidade provocadas por esta bactéria (GRAY *et al.*, 2004; NORTON *et al.*, 2001; ROCHE *et al.*, 2001).

Em um estudo realizado por Wiedmann *et al.* (1997) foi demonstrado que o ensaio de formação de placas de lise pode ser utilizado como uma ferramenta de triagem para fenótipos associados à virulência. Nesse trabalho, as cepas pertencentes à linhagem I (1/2b e 4b) apresentaram halos 20% maiores que as cepas da linhagem II (1/2a e 1/2c).

Gray *et al.* (2004) estudaram cerca de 1.000 cepas de *L. monocytogenes* isoladas de fontes humanas e alimentares. Para subtipagem utilizou-se a técnica de ribotipagem e para análise de

citopatogenicidade, o ensaio de formação de placas em fibroblastos murinos L2. Observou-se que algumas cepas de origem clínica apresentaram pequenos halos de lise e que cepas pertencentes à linhagem II apresentaram um códon terminal prematuro no gene *inlA*. Além disso, também foi observado que, para esta mesma linhagem, as cepas apresentaram polimorfismos alélicos no gene *hly*, o que poderia estar relacionado ao seu não isolamento de amostras clínicas (não sendo responsáveis pelos casos de listeriose).

Franciosa *et al.* (2005), pela análise de polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição (RFLP), observaram que as cepas de *L. monocytogenes* pertencentes aos sorotipos 1/2b e 4b, isoladas de casos de listeriose invasiva e gastroenterite, apresentaram perfis distintos em relação ao gene *inlB*. Ao realizarem experimentos com camundongos A/J com estas mesmas cepas verificou-se maior população para 1/2b que 4b, dentro das células intestinais Caco-2. Este fator tanto pode refletir a maior capacidade de sobrevivência e multiplicação de 1/2b quanto a rápida disseminação por 4b.

Em outro estudo, cepas de *L. monocytogenes* pertencentes ao sorogrupo 4 foram comparadas em relação a sua virulência a camundongos pós-inoculação intraperitoneal, assim como a produção dos fatores de virulência PrfA-dependentes. As cepas pertencentes aos sorotipos 4b e 4ab apresentaram maior poder de invasão e multiplicação no fígado e baço destes animais. Em experimentos realizados com culturas celulares Caco-2, as mesmas características foram observadas com estas cepas. A menor virulência foi observada para as cepas 4a, 4c, 4d e 4e, que apresentaram menor capacidade invasiva e proliferativa nos ensaios *in vivo* e *in vitro*. Já quando os ensaios foram realizados em macrófagos J774 nenhuma diferença entre as cepas do sorotipo 4 foi observada. Todos os resultados foram expressos em relação à cepa EGD, que possui potencial patogênico já descrito (SOKOLOVIC *et al.*, 1996).

A determinação e quantificação de algumas enzimas liberadas pelas células eucarióticas devido a um efeito citotóxico externo, como infecção por cepas de *L. monocytogenes*, também têm sido incluídas nos estudos da diversidade de virulência. Muitas das pesquisas utilizam a liberação de lactato desidrogenase e/ou fosfatase alcalina como indicador de citotoxicidade (BARSIG; KAUFMANN, 1997; BHUNIA; WESTBROOK, 1998; GRAY; BHUNIA, 2005; PUERTOLLANO *et al.*, 2003; ROBERTS *et al.*, 2005; WEI *et al.*, 2005).

Pesquisas em regulação da expressão gênica bacteriana tornaram-se uma área de grande interesse no entendimento do processo infeccioso durante interação patógeno-hospedeiro. Dentre as metodologias, tem sido otimizada para análise e quantificação gênica a Reação em Cadeia da Polimerase por Transcrição Reversa Quantitativa em Tempo Real (Q-RT-PCR) que apresenta grande rapidez, menor possibilidade de contaminação laboratorial, além de alta sensibilidade e especificidade. Portanto, a Q-RT-PCR tornou-se um dos métodos de escolha para a análise de regulação de expressão gênica tanto em organismos procarióticos como eucarióticos (GIBSON *et al.*, 1996; HEID *et al.*, 1996).

A Q-RT-PCR quantifica os ácidos nucleicos em sua fase exponencial. O ponto que detecta o ciclo no qual a reação atinge o limiar da fase exponencial é denominado como valor de *Cycle Threshold* (CT). Este ponto permite a quantificação pela fluorescência emitida durante a reação. A emissão desta fluorescência gera um sinal que aumenta na proporção direta da quantidade de produto da PCR. Desta forma, os valores de CT fluorescência são gravados durante cada ciclo e representam a quantidade de produto amplificado. Para a obtenção de resultados satisfatórios diversos parâmetros devem ser levados em conta, como o ajuste de concentração final de ácido nucleico, a normalização dos resultados em função do número de bactérias e, também, esta mesma normalização em função de um gene *housekeeping*, que deve ser amplificado junto para que se possa comparar com o gene em estudo (LIVAK *et al.*, 1995).

Esta quantificação tem auxiliado muito na determinação de fatores intrínsecos e extrínsecos que possam estar envolvidos na regulação da expressão dos genes de virulência de *L. monocytogenes*, tornando-se, desta forma, ferramenta útil junto aos outros ensaios previamente descritos.

Assim, apesar de todo o avanço ocorrido e do nível de detalhamento existente até o momento, os dados gerados ainda não fornecem subsídios para o perfeito entendimento sobre o potencial de virulência de "isolados de campo" e a possibilidade de uma determinada cepa causar doença (KATHARIOU, 2002).

JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

2. Justificativa e Objetivos

A caracterização de virulência de cepas de *L. monocytogenes* é importante para a compressão do mecanismo pelo qual o microrganismo irá estabelecer o quadro infeccioso no indivíduo, proporcionando maior controle no impacto à saúde pública.

Além disso, o melhor entendimento das características patogênicas e da variabilidade da virulência destas cepas isoladas de alimentos, de ambientes de processamentos de alimentos e de amostras clínicas proporcionaria a possibilidade da utilização de um marcador molecular de virulência que reduziria o número de recolhimentos de alimentos que não apresentariam risco à população.

Com isso, o objetivo deste estudo foi comparar o comportamento de cepas de *L. monocytogenes* recentemente isoladas de alimentos e/ou ambiente de planta processadora de alimentos com àquele de cepas relacionadas a casos clínicos, avaliando-se:

- capacidade de invasão;
- proliferação intracelular;
- disseminação intercelular;
- citotoxicidade;
- transcrição gênica dos genes de virulência *plcA*, *plcB* e *actA*.

MATERIAL E MÉTODOS

3. Material e Métodos

3.1. Material

3.1.1. Cepas de *L. monocytogenes*

As cepas de *L. monocytogenes* utilizadas em todos os experimentos estão descritas na tabela 1. Os isolados 1/2B, 1/2C e 4BENV pertencem ao arquivo de cepas do Laboratório de Microbiologia de Alimentos – FCF/USP e foram isoladas em uma mesma planta processadora de alimentos. Já a cepa 4BCLIN foi cedida pelo Instituto Adolfo Lutz de Campinas. A cepa P14 foi isolada de um caso de listeriose (VAZQUEZ-BOLAND *et al.*, 1991) e cedida pela Universidade de Bristol, sendo utilizada como referência neste estudo. P14A é um mutante espontâneo da cepa P14 que apresenta elevada atividade hemolítica e fosfolipídica (RIPIO *et al.*, 1996). As cepas mutantes de *L. monocytogenes* $\Delta actA$ e $\Delta prfA$ (MONZO *et al.*, 2007) foram utilizadas como controle negativo nos ensaios de formação de placas de lise e atividade hemolítica e fosfolipídica, respectivamente. Ambas foram obtidas pelo nocaute de genes específicos da cepa P14A.

Tabela 1 – Cepas de *L. monocytogenes* utilizadas neste estudo

Nomenclatura	Sorotipo	Ano de isolamento	Origem
1/2B	1/2b	1998	<i>nuggets</i> de frango*
1/2C	1/2c	1998	linha de processamento de <i>nuggets</i> de frango*
4BENV	4b	1998	linha de processamento de <i>nuggets</i> de frango*
4BCLIN	4b	2001	sangue
P14	4b	1991	sangue

* cepas de *L. monocytogenes* isoladas de uma mesma planta processadora de alimentos.

3.1.2. Células eucarióticas

Células epiteliais derivadas de rim bovino (MDBK - *Madin-Darby Bovine Kidney*), células epiteliais humanas derivadas de carcinoma cervical (HeLa) e fibroblastos murinos (L929) foram utilizados para os experimentos. Os estoques celulares foram mantidos em *Dulbecco's modified Eagle's medium* (DMEM, BioWhittaker, Reino Unido), suplementado de 20% de soro fetal bovino (BioWhittaker, Reino Unido) e de 10% de dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma-Aldrich, Reino Unido), armazenados a -20°C por 24 horas, e, posteriormente transferidos a -80°C.

3.2. Métodos

3.2.1. Preparo dos inóculos bacterianos

As cepas de *L. monocytogenes* foram incubadas em caldo de infusão de cérebro e coração (BHI, Difco, Reino Unido) por 24 horas a 37°C sob agitação de 200 rpm em *shaker* (INNOVA 4230, New Brunswick Scientific, Reino Unido) até atingirem a fase estacionária. A seguir, as suspensões foram diluídas 1:100 em caldo BHI e incubadas a 37°C sob agitação de 200 rpm até atingir a fase exponencial, que foi avaliada por espectrofotometria (Ultrospec 3300 Pro, Amersham Biosciences, Reino Unido) ($A_{600} = 1,5$). Alíquotas foram centrifugadas a 5.836 x g por 10 minutos a 4°C (6K15, Sigma Laboratory, Alemanha) e lavadas por três vezes com 50 mL de solução salina fosfatada tamponada (PBS) a 4°C. O pellet foi ressuspenso em 4 mL de solução 20% glicerol-PBS, homogeneizado e 100µl desta suspensão foram distribuídos em tubos de 1,5mL.

Determinou-se a população bacteriana em pelo menos três destas alíquotas pela semeadura superficial em ágar de infusão de cérebro e coração (BHI, Difco, Reino Unido) e estimou-se a

população média dos inóculos (UFC/mL). As alíquotas foram armazenadas a -80°C até o momento de uso.

3.2.2. Células eucarióticas

As células MDBK e HeLa foram mantidas em garrafas de cultura de 75cm² (Corning, Reino Unido) em DMEM e as células L929 foram mantidas em RPMI (BioWhittaker, Reino Unido), ambos suplementados com 10% de soro fetal bovino, 2mM L-glutamina (BioWhittaker, Reino Unido) e 10% solução penicilina-estreptomicina-anfotericina B (BioWhittaker, Reino Unido) em estufas a 37°C e atmosfera de 5% de CO₂ (Hera Cell CO₂, Heraeus, Reino Unido).

3.2.3. Curvas de crescimento

As cepas de *L. monocytogenes* 1/2B, 1/2C, 4BENV e 4BCLIN 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. Estes frascos foram incubados a 37°C sob agitação de 200 rpm. A cada uma hora, alíquotas de 1mL foram coletadas em cubetas de poliestireno (Fisher Scientific, Reino Unido) para realizar-se a leitura em espectrofotômetro e determinar assim a absorbância das amostras. Este mesmo procedimento foi realizado pelo período total de 9 horas, momento em que todas as cepas já se encontravam na fase estacionária. Em paralelo realizou-se a enumeração de *L. monocytogenes*, nos mesmos intervalos de tempos anteriormente descritos, por semeadura em profundidade em ágar BHI.

3.2.4. Atividade hemolítica e fosfolipídica

As cepas de *L. monocytogenes* 1/2B, 1/2C, 4BENV, 4BCLIN, P14, P14A e $\Delta prfA$ foram semeadas em placas contendo ágar sangue de carneiro a 5% (bioMérieux, França), ágar BHI contendo 0,5% de solução de gema de ovo e ágar BHI contendo 0,5% de solução de gema de ovo e 5% de carvão ativado (Merck, Alemanha). Todas as placas foram incubadas a 37°C por 24 horas.

3.2.5. Ensaio de Invasão

Os ensaios de invasão foram conduzidos segundo Gaillard *et al.* (1987), com algumas modificações. As células eucarióticas MDBK, HeLa e L929 foram incubadas, no dia anterior à infecção, em placas de cultura de 24 orifícios (Corning, Reino Unido), com $1,2 \times 10^5$ células/orifício, à 37°C em atmosfera de 5% de CO₂ nos meios adequados (item 3.2.2), sem antibiótico, até atingirem confluência de 90% (aproximadamente 2×10^5 células/orifício). As alíquotas bacterianas foram descongeladas, centrifugadas a 7.000 x g por 3 minutos (Mini Spin Plus, Eppendorf, Estados Unidos) e lavadas com PBS por duas vezes.

As células eucarióticas foram infectadas com taxa de infecção (MOI) de 50:1 (bactéria por célula eucariótica). As placas foram centrifugadas por 3 minutos a 172 x g (centrífuga 4-15C, Sigma Laboratory, Alemanha) e incubadas a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂ por 30 minutos. O meio de cultura foi removido e as células foram lavadas duas vezes com PBS. Adicionou-se DMEM ou RPMI, dependendo da linhagem celular, contendo 100µg/mL de gentamicina (Sigma-Aldrich, Estados Unidos) e incubou-se por 1 hora nas mesmas condições anteriores. Transcorrido este tempo, as amostras foram lisadas pela adição de 100µl de solução de Triton X-100 (Sigma-Aldrich, Estados Unidos) a 1% por 3 minutos.

Diluições seriadas foram realizadas e semeadas superficialmente em placas contendo ágar BHI e incubadas a 37°C (estufa 800, Memmert, Alemanha). As colônias foram contadas e a porcentagem relativa de invasão foi determinada usando a seguinte equação:

$$\% \text{ de invasão} = \frac{\text{UFC recuperadas}}{\text{UFC inóculo}} \times 100$$

3.2.6. Ensaio de Proliferação

Para os experimentos de proliferação, adotou-se o mesmo protocolo dos ensaios de invasão. As células eucarióticas MDBK e HeLa foram preparadas conforme descrito em 3.2.5. Estas foram infectadas com MOI 10:1, para a cepa P14A, e 50:1, para as demais cepas. A taxa de infecção foi definida com base nos resultados obtidos com os experimentos de invasão. As placas foram centrifugadas por 3 minutos a 172 x g e incubadas a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂ por 30 minutos. O meio de cultura foi removido e as células foram lavadas duas vezes com PBS. Adicionou-se DMEM contendo 100µg/mL de gentamicina e incubou-se por 1 hora nas mesmas condições anteriores.

Transcorrido este tempo, as amostras correspondentes ao tempo zero (T0) foram lisadas com 100µl de solução de Triton X-100 a 1% por 3 minutos. Aproximadamente 2 horas pós-infecção a concentração de gentamicina foi reduzida para 25µg/mL. As células foram lisadas também 4, 8 e 24 horas pós-infecção. Diluições seriadas foram realizadas e semeadas superficialmente em placas de ágar BHI. Para avaliar a capacidade de proliferação foi estimado o fator de proliferação intracelular (IGC) usando a equação:

$$\text{IGC} = \frac{\text{UFC Tn} - \text{UFC T0}}{\text{UFC T0}}$$

3.2.7. Ensaio de Citopatogenicidade

Os ensaios de citopatogenicidade foram realizados de acordo com Oaks *et al.* (1985), com adaptações. Linhagens celulares MDBK, HeLa e L929 foram incubadas em placas de 6 orifícios (Corning, Reino Unido), com 1×10^6 células/orifício em meio DMEM (suplementado com 10% de soro fetal bovino e 2mM de L-glutamina), no dia anterior ao experimento. Neste mesmo dia, as cepas de *L. monocytogenes* foram inoculadas em 10 mL de caldo BHI e incubadas por 24 horas a 37°C sob agitação a 200 rpm.

No dia seguinte, todas as cepas foram diluídas 1:50 em caldo BHI e incubadas a 37°C por, aproximadamente, 4 horas, sob agitação a 200 rpm até atingir $A_{600} = 1$. Um mL desta suspensão foi centrifugado por 3 minutos a $7.000 \times g$ e o pellet foi ressuscitado em 1 mL de meio DMEM. As cepas bacterianas foram então diluídas 1:10.000 e as células eucarióticas foram infectadas com 10 µl dessa suspensão, sendo as placas incubadas por 2 horas a 37° C em atmosfera de 5% de CO₂. Após este período foram realizadas duas lavagens com PBS e incubou-se as células por 30 minutos com DMEM contendo 50µg/mL de gentamicina.

Após três lavagens das placas com PBS adicionou-se DMEM contendo 2% de ágar-ágar (Sigma-Aldrich, Reino Unido) e 5µg/mL de gentamicina, sendo as placas então incubadas por 3 dias a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂. Para visualizar a formação das placas de lise foram adicionados aos orifícios 1,5 mL de solução vermelho neutro (0,33%) (Sigma-Aldrich, Reino

Unido) diluída 1:10 em PBS. As placas foram incubadas por 2 horas a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂ e posteriormente as imagens foram capturadas e digitalizadas em escâner (Arcus II, AGFA, Estados Unidos) e analisadas com o *software AdobePhotoshop 5.0 LE*. Para facilitar a visualização, utilizou-se aumento de 200x, determinando-se as dimensões X e Y das placas de lises formadas, e, com as médias destes valores, construíram-se os gráficos.

3.2.8. Ensaio de Citotoxicidade

Como índice de citotoxicidade celular dois parâmetros foram estudados: morte celular empregando-se a técnica de citometria de fluxo, de acordo com Aubry *et al.* (1999), e liberação da enzima lactato desidrogenase (LDH), segundo Decker; Lohmann-Mather (1988).

3.2.8.1. Liberação da enzima lactato desidrogenase (LDH)

Os sobrenadantes de culturas celulares utilizados como amostras para a determinação de LDH foram obtidos durante os experimentos de morte celular para as células MDBK e durante os ensaios de proliferação em células HeLa. Antes de descartar o meio de cultura para iniciar os processos de lavagens (3.2.6 e 3.2.8.1), alíquotas de 200µl do meio DMEM foram recolhidas, para cada tempo e cada cepa, e foram analisadas com o *kit In vitro toxicology assay lactate dehydrogenase based* (Sigma-Aldrich, Reino Unido), segundo instruções do fabricante.

Resumidamente, 100µl das amostras foram adicionados em placas de 96 orifícios (Corning, Reino Unido) contendo 10 µl de tampão de lise (reagente que acompanha o *kit*) e centrifugados a 250 x g por 4 minutos. Após a centrifugação, incubou-se as placas a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂ por 10 minutos. Foi preparada uma solução contendo partes proporcionais de substrato, enzima e solução corante (reagentes que acompanham o *kit*), e esta foi adicionada na proporção

de 2:1 às amostras. A placa foi incubada no escuro e à temperatura ambiente por 30 minutos. Para interromper a reação, 20µl de HCl 1N (Sigma-Aldrich, Reino Unido) foram adicionados a todas as amostras. Estas foram analisadas por espectrofotometria em comprimento de onda de 492nm (Multiskan EX, Labsystems, Reino Unido).

3.2.8.2. Ensaio de morte celular

Células epiteliais MDBK e HeLa foram incubadas 12 horas antes do início do experimento em placas de 6 orifícios, de forma a se ter aproximadamente 4×10^5 células/orifício. As células foram infectadas conforme apresentado em 3.2.6. Foram coletadas amostras nos tempos de 8 e 24 horas pós-infecção.

Transcorrido o tempo de ação da gentamicina, as amostras foram preparadas para leitura em citômetro de fluxo (Epics XL-MCL, Beckman-Coulter, Reino Unido). Para tanto, removeu-se o meio de cultura das placas e lavou-se 2 vezes com PBS, depois se adicionou 400µl de tripsina-versene (500mg/L - 200mg/L) e incubou-se a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂ por 3 minutos, para desprender as células. Adicionou-se 1,6 mL de DMEM, homogeneizou-se vagarosamente, e as amostras foram divididas em duas partes: 1mL foi utilizado para detecção de morte celular e o outro 1mL, como controle da viabilidade das células eucarióticas e da população bacteriana. Adicionou-se às amostras tampão gelado [10mM Hepes (Sigma), 140mM NaCl (Sigma) e 2.5mM CaCl₂ (Sigma)], suficiente para completar o volume final do tubo, e centrifugou-se a 416 x g por 5 minutos a 4°C. Descartou-se o sobrenadante e repetiu-se novamente o processo.

O tampão empregado continha concentração ótima de cálcio, necessária para a ligação de anexina V com o fosfolipídio fosfatidilserina (PS) exposto na superfície celular. Foram adicionados às amostras 1µl de solução anexina V-FITC e 5 µl de iodeto de propídio

(Immunotech, Beckman-Coulter, Reino Unido) e incubou-se o tubo por 15 minutos no escuro, à temperatura ambiente. As amostras foram novamente lavadas com tampão gelado e centrifugadas nas mesmas condições anteriores. O sobrenadante foi descartado e as células ressuspendidas em 400 µl de tampão. As amostras foram lidas no citômetro de fluxo. As células apoptóticas coram-se somente pela Anexina V-FITC, enquanto as células necróticas coram-se pelo iodeto de propídio. Como controle positivo utilizou-se (em um dos orifícios) o indutor de apoptose estaurosporina (200nM em DMSO), que foi incubado 4 horas antes dos tempos de incubação previamente estabelecidos.

3.2.9. Visualização dos filamentos de actina

Para a visualização e enumeração dos filamentos de actina aderidos às bactérias realizou-se o mesmo protocolo utilizado nos ensaios de proliferação (3.2.6). Entretanto, os orifícios continham lamínulas na qual as células eucarióticas HeLa iriam aderir.

As lamínulas com células foram removidas dos orifícios nos tempos de 2 e 3 horas pós-infecção, sendo fixadas em paraformaldeído 4% (Sigma-Aldrich, Reino Unido) por pelo menos 30 minutos e mantidas sob refrigeração até o momento de realizar-se a reação de fluorescência.

Posteriormente, foi adotado o protocolo de Karunasagar *et al.* (1993). Cada lamínula foi lavada 3 vezes com PBS e permeabilizada com Triton X-100 a 0,1%, por 10 minutos, sendo lavada novamente com PBS. Anticorpos de coelho anti-*Listeria* polivalente tipos 1 e 4 (Difco, Reino Unido) foram adicionados na proporção 1:200 (em PBS), para a visualização das bactérias. As lamínulas foram incubadas, à temperatura ambiente, por 45 minutos no escuro. Transcorrido esse tempo, as mesmas foram lavadas 3 vezes com PBS. Preparou-se um conjugado faloidina-TRITC (Isotiocianato de Tetrametil-Rodamina) (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Estados

Unidos) diluído 1:2.000 em PBS, adicionado de anticorpo de cabra secundário anti-IgG-Cy2 (cianina) (1:400 em PBS) (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Estados Unidos). Por fim, incubou-se as lamínulas por mais 45 minutos, à temperatura ambiente, no escuro.

A faloidina é uma substância com a propriedade de ligar-se à actina, estabilizando-a. O fluorocromo TRITC fluoresce na região vermelha do espectro visível de luz e a Cy2 na região verde. Assim, as bactérias foram visualizadas em verde e a proteína actina em vermelho. As lamínulas foram lavadas novamente em PBS e deixadas secar. Após este período, as lâminas foram montadas com solução de glicerina tamponada adicionada de *anti-fading* (Vectashield, Vector Laboratories, Reino Unido), com a finalidade de manter a fluorescência por longo prazo, e vedou-se com esmalte. As lâminas foram examinadas em microscópio de fluorescência (DMIRE2, Leica, Alemanha); para a documentação foi utilizado o *software OpenLab* (Improvision, Reino Unido).

3.2.10. Transcrição gênica de *plcA*, *plcB* e *actA*

Para a quantificação da transcrição dos genes de virulência das cepas de *L. monocytogenes* foi empregada a metodologia da Q-RT-PCR segundo Rodriguez-Lazaro *et al.* (2006). Os genes escolhidos para este estudo foram *ldh* (*housekeeping*), *plcA*, *plcB* e *actA* (genes alvos). A sequência dos *primers* e sondas utilizados (Tabela 2) baseou-se em regiões de homologia existentes entre os genomas das cepas de *L. monocytogenes* EGD-e e F2365 (acesso *GenBank* número NC_003210 e NC_002973, respectivamente) (RODRIGUEZ-LAZARO *et al.*, 2006). Todos os oligonucleotídeos foram sintetizados por Metabion (Alemanha), com exceção das sondas Taqman® MGB, que foi adquirida de Applied Biosystems (Reino Unido).

As células HeLa foram incubadas 24 horas antes da realização do experimento em placas de cultura de 60 cm² (TPP, Reino Unido), em meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino e 10% de glutamina. Para o inóculo bacteriano foram empregadas as alíquotas congeladas que haviam sido preparadas previamente (3.2.1) e a infecção foi realizada com MOI de 1:100. A partir daí, seguiu-se o mesmo protocolo utilizado nos ensaios de proliferação (3.2.6), sendo que as amostras para análise foram obtidas 5 horas pós-infecção.

Para a obtenção das amostras, as células HeLa foram lavadas com PBS por três vezes e, posteriormente, foram soltas dos orifícios adicionando-se 700µl de PBS a 4°C, raspando-se com espátula (Fischer Scientific, Reino Unido). Após homogeneização em vortex, 500µl da amostra foram transferidos para tubo contendo 1mL de reagente protetor de RNA bacteriano (Qiagen, Reino Unido). Para determinação da população bacteriana, 100µl das amostras obtidas foram transferidos para tubos contendo 100µl de Triton X-100 a 1% e esperou-se 3 minutos para que ocorresse a lise das células eucarióticas. Posteriormente, diluições decimais foram realizadas e semeadas superficialmente em placas de ágar BHI para a determinação da população de bactérias intracelulares.

Para a extração do RNA, a amostra, junto com o reagente protetor, foi agitada em vortex por 5 segundos e posteriormente incubada, à temperatura ambiente, por 5 minutos. Transcorrido este tempo, as amostras foram centrifugadas a 5.000 x g por 10 minutos a 4°C. O pellet foi resuspenso em tampão RA1 (Macherey-Nagel, Alemanha) contendo 1:100 β-mercaptoetanol (Sigma-Aldrich, Alemanha) e então a suspensão foi transferida para tubo contendo matriz de lise B (Q-Biogen, Alemanha), sendo processada no equipamento FastPrep (Q-Biogen, França) por 40 segundos.

As amostras foram então centrifugadas a 12.000 x g por 5 minutos a 4°C, e o sobrenadante transferido para um novo tubo. Um volume igual de etanol 70% foi adicionado e homogeneizado. A solução de ácido nucléico foi purificada usando-se o *kit* Nucleospin RNA II (Macherey-Nagel, Alemanha). A solução eluída foi tratada com 10U de DNase I (RQ1 RNase-free DNase I, Promega) por 30 minutos, a 37°C. A solução de RNA foi submetida à nova purificação utilizando-se o mesmo *kit*.

As amostras de RNA foram transcritas com Sistema Reverso Improm-II (Promega, Alemanha) em uma reação de 20µl, incluindo 1X tampão de reação Improm-II, 1,5mM de Mg^{2+} , 0,5 mM dNTPs, 100µM de hexâmeros randômicos (Eurogentec, Bélgica), 5µl de RNA e 1µl de transcriptase reversa Improm-II (Promega, Alemanha). Antes da transcrição reversa, as amostras de RNA foram desnaturadas por 5 minutos a 65°C. As condições da transcrição reversa foram: 25°C por 5 minutos, 42°C por 1 hora e 70°C por 15 minutos para inativação da enzima. Todas as amostras de cDNA foram diluídas 1:10 antes de se proceder com Q-RT-PCR.

Os tubos de reação continham um volume final de 25µl, correspondentes a 1X Tampão II Taqman PCR (Applied Biosystems, Reino Unido), 6mM de $MgCl_2$, 200µM dNTP, 300nM de primers, 150nM de sondas (Tabela 1), 1 U de DNA polimerase AmpliTaq Gold (Applied Biosystems, Reino Unido) e 5µl de cDNA.

A mistura de reação foi adicionada às placas de cultura de 96 orifícios (Applied Biosystems, Reino Unido) que foram seladas com papel filme (Applied Biosystems, Reino Unido). As reações foram processadas no equipamento iCycler (BioRad, Alemanha) usando o seguinte programa: 10 minutos a 95°C, 40 ciclos de 15 segundos a 95°C e 1 minuto a 60°C. Os resultados foram avaliados pelo *software iCycler IQ Optical System* (BioRad, Alemanha).

Foram realizados 3 experimentos independentes, em duplicata, e para cada um deles foi realizada uma curva padrão com concentrações decimais conhecidas de DNA genômico de *L. monocytogenes* P14. A quantificação foi feita por meio da interpolação dos valores de CT das amostras de concentrações conhecidas (fornecidos pelo equipamento) em uma curva de regressão linear ($y = ax + b$). Com esses dados obteve-se o número de transcritos de cada gene e a transcrição gênica normalizada foi obtida pela seguinte equação:

$$\text{Transcrição Gênica} = 10^{\frac{(b - \text{valor de CT} / a) \text{ do gene alvo}}{(b - \text{valor de CT} / a) \text{ do gene housekeeping}}}$$

onde:

a: coeficiente angular;

b: coeficiente linear;

CT: *cycle threshold*.

Tabela 2 - Oligonucleotídeos empregados neste estudo.

Gene	Função	Tipo	Sequência	Tamanho (pb)
<i>ldh</i>	lactato	<i>primer forward</i>	5'-GCTCCATGCTGGGAATTC TG-3'	64
	desidrogenase	<i>primer reverse</i>	5'-ATGCTCGTAACGTCCATGGTT-3'	
		sonda Taqman®	5'-FAM-CATCCTTGGCGAACACGGCGA-BHQ1-3'	
<i>plcA</i>	fosfolipase C -	<i>primer forward</i>	5'- GTACAATGACATCGTTTGTGTTTGAG-3'	88
	fosfatidilinositol	<i>primer reverse</i>	5'- CAGGTACACATGATACGATGAGCTATAA -3'	
	específica	sonda Taqman® MGB	5'- FAM-AGTGGTTTGGTTAATGTCC-MGB-NFQ-3'	
<i>plcB</i>	fosfolipase C -	<i>primer forward</i>	5'-TGGAAAAAGGATACAGTGGAACCT-3'	84
	fosfatidilcolina	<i>primer reverse</i>	5'-CCTGCCAAAGTTTGCTGTGA-3'	
	específica	sonda Taqman®	5'-FAM-CTCTTAGTCTAGCTCCAG-MGB-NFQ-3'	
<i>actA</i>	proteína	<i>primer forward</i>	5'-AAGAAATTGATCGCCTAGCTGATT-3'	71
	polimerizadora	<i>primer reverse</i>	5'-GTAAAAAACC CGCATTTCTTGAGT-3'	
	de actina	sonda Taqman®MGB	5'-FAM-TTTCCTGTTCTCTATCTCT-MGB-NFQ-3'	

FAM - 6-carboxyfluoresceína; BHQ1 - quencher black hole; MGB - ligante minor groove; NFQ - quencher não fluorescente.

3.2.11. Análise estatística

Para verificar a existência de diferenças entre os tratamentos (cepas) e controle, foi realizada a análise de variância (ANOVA). Anteriormente a esta análise, verificou-se a adequação às pressuposições de ANOVA (VIEIRA, 2006). Posteriormente, foi realizado o pós-teste de múltiplas comparações de *Tukey* (quando o interesse era comparar as cepas entre si) ou o pós-teste de *Dunnnett* (quando o interesse era comparar as cepas com o grupo controle) para avaliar a diferença entre pares. Os valores de $p < 0,05$ foram considerados estaticamente significativos. Os resultados obtidos nos ensaios de PCR em Tempo Real e liberação de LDH foram analisados com o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, porque as pressuposições da ANOVA não foram seguidas. As análises estatísticas foram feitas com os programas *Minitab® for Windows* versão 15 (MINITAB, 2007) e SSPS versão 13 (STATISTICAL..., 2004).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4. Resultados e Discussão

4.1. Curvas de crescimento de cepas de *L. monocytogenes* em meio de cultura

Na figura 4 pode-se observar o comportamento das cepas utilizadas neste estudo, 1/2B, 1/2C, 4BENV e 4BCLIN, no decorrer de 9 horas de incubação. Pelos resultados obtidos com as curvas de crescimento, algumas características podem ser observadas em relação à duração das fases *lag* e exponencial dos diferentes sorotipos de *L. monocytogenes*. Verifica-se que as cepas 1/2B e 4BCLIN apresentaram comportamentos semelhantes. Estas tiveram uma fase *lag* de curta duração (3 horas), demonstrando rápida adaptação às condições *in vitro*, iniciando então a multiplicação exponencial. Após 7 horas de incubação pode-se verificar que estas cepas chegam a atingir absorbância entre 2,5-3,0 (Figura 4). Já os isolados 1/2C e 4BENV apresentaram comportamento distinto quando comparados aos descritos anteriormente, com fase *lag* mais longa (4 horas), indicando menor facilidade de adaptação (Figura 4).

Ao iniciar a fase exponencial, as cepas 1/2B e 4BCLIN apresentaram população superior de aproximadamente 1 log UFC/mL às de 1/2C e 4BENV (Anexo A). A diferença observada no comportamento das cepas de *L. monocytogenes* para este ensaio não mostrou ser sorotipo dependente.

Apesar destes resultados terem sido obtidos em experimentos *in vitro*, pode-se inferir que, uma vez que estes microrganismos necessitam de maior tempo de adaptação às condições ambientais, isto poderia refletir quando dentro do hospedeiro. Com isso pode-se supor que o potencial patogênico destes isolados (1/2C e 4BENV) seria inferior, pois quanto mais longo o tempo de adaptação e de início da multiplicação, e do conseqüente ciclo de infecção, maior a chance do hospedeiro apresentar uma resposta imune contra o microrganismo invasor.

Embora a cepa 4BENV apresente fase *lag* mais longa, este isolado atingiu valores de absorbância iguais às de 1/2B e 4BCLIN. Já para a cepa 1/2C, o valor máximo de absorbância obtido foi superior às demais cepas em estudo ($p < 0,05$). Este resultado indica que se estas bactérias conseguirem sobreviver às condições adversas dos alimentos ou do próprio hospedeiro, são capazes de atingir populações elevadas, colonizando, assim, o local.

Figura 4. Curvas de crescimento de cepas de *L. monocytogenes* a 37°C, sob agitação de 200 rpm, em um intervalo de 9 horas de incubação. Média de três experimentos em duplicata. 1/2B: sorotipo 1/2b (alimento); 1/2C: sorotipo 1/2c (ambiente); 4BENV: sorotipo 4b (ambiente); 4BCLIN: sorotipo 4b (sangue).

Estes resultados são similares aos obtidos anteriormente com alguns outros estudos. Buncic *et al.* (2001) avaliaram o comportamento de cepas de *L. monocytogenes* isoladas de amostras clínicas (sorotipo 4b) e outras isoladas de alimentos (sorotipo 1/2a), após a incubação destas em temperatura de refrigeração. Este procedimento teve como objetivo simular as condições normais de estocagem dos alimentos. Foi observado que a cepa pertencente ao sorotipo 4b apresentou

uma fase *lag* mais curta em relação às cepas pertencentes ao sorotipo 1/2a (ambas de origem clínica), além de ser mais patogênica quando inoculada em embriões de galinha. Avery e Buncic (1997) também já haviam relatado o mesmo, porém comparando cepas pertencentes ao sorogrupo 4 (isolado clínico) e sorogrupo 1 (isolado de carne).

Ressalta-se, no entanto, que o isolado de origem alimentar 1/2B, empregado no presente estudo, apresentou comportamento semelhante ao de origem clínica, diferente do que se havia observado nos estudos previamente descritos.

As cepas de origem não clínica (1/2B, 1/2C e 4BENV) apresentaram, ao final de 9 horas de incubação, comportamento semelhante ao das de origem clínica (4BCLIN). É necessário, no entanto, avaliar diferentes características importantes durante o ciclo de infecção de *L. monocytogenes*, para se inferir sobre o potencial patogênico destas cepas.

Buncic *et al.* (2001) demonstraram que os isolados pertencentes ao sorotipo 4b aparentemente têm tendência maior de manter elevada patogenicidade, mesmo após condições ambientais desfavoráveis (temperatura baixa), que isolados de alimentos. Este fenômeno pode indicar que as cepas capazes de causar doenças são mais resistentes às condições reais que se pode encontrar em um alimento, mesmo não sendo predominante neste.

4.2. Atividade hemolítica e fosfolipídica de cepas de *L. monocytogenes* em meio de cultura

Com a finalidade de observar *in vitro* as atividades hemolítica (Hly) e fosfolipídica (PlcB) realizou-se a semeadura das cepas de *L. monocytogenes* em ágar sangue, ágar BHI enriquecido de lecitina e ágar BHI com lecitina suplementado com carvão ativado. A maioria das cepas testadas (P14, 1/2B, 4BENV, 4BCLIN) apresentou fenótipo uniforme, caracterizado por fraca ou

nenhuma reação, independente do sorotipo ou de sua origem em relação à hemólise e à atividade fosfolipídica na ausência do carvão ativado.

Pode-se observar, em relação à atividade fosfolipídica, que a indução e conseqüente produção da fosfolipase foi mais evidente para as cepas 1/2C e P14A, sendo esta última mais exacerbada (Figura 5A). O mesmo padrão se apresentou em relação à atividade hemolítica (Figura 5C). Quando se adicionou carvão ativado ao meio de BHI com lecitina, a fim de ativar o fator regulatório positivo PrfA, verificou-se um efeito deste em *plcB*, em todos os isolados, com exceção do controle negativo ($\Delta prfA$) (Figura 5B).

Geoffroy *et al.* (1989 e 1991) observaram que a adição de carvão ativado aumenta a expressão de proteínas, como as fosfolipases e hemolisina. Ermolaeva *et al.* (2004) sugeriram que o carvão ativado atua como quelante de uma substância repressora produzida por cepas de *L. monocytogenes* na fase exponencial, o que impediria a ativação de *prfA*.

Desde o isolamento de cepa P14A muitos estudos têm sido realizados para avaliar as diferenças de sua virulência *in vitro* e *in vivo*, quando comparada às cepas isoladas de ambiente, de alimentos e de amostras clínicas. Já se sabe que os genes PrfA-dependentes estão superexpressos em diferentes meio de cultura para P14A (RIPIO *et al.*, 1997; RIPIO *et al.*, 1996)

Especula-se que a expressão constante do gene *prfA* e, conseqüentemente, de todos os genes PrfA-dependentes da cepa P14A somente beneficia *L. monocytogenes* em experimentos realizados em meio de cultura, uma vez que quando esta se encontra no interior citoplasmático, a cepa selvagem (P14) iguala-se, em relação à expressão dos fatores de virulência, à da mutante

(P14A). Experimentos com camundongos revelaram que para ambos os isolados a dose letal é a mesma, assim como a multiplicação destes em órgãos como fígado e baço (RIPIO *et al.*, 1996).

Cossart *et al.* (1989) relataram que a proteína Hly estava relacionada com a capacidade virulenta de cepas de *L. monocytogenes*. Este estudo foi conduzido com cepas mutantes de *L. monocytogenes* (Δhly) que mostraram ser avirulentas em camundongos, por meio de inoculação intravenosa.

Posteriormente, foi demonstrada a não relação entre hemólise e patogenicidade intracelular (COFFEY *et al.*, 1996; ERDENLIG *et al.*, 2000), apesar desta característica ainda ser considerada como critério de definição de espécie para *L. monocytogenes*.

Não se pode afirmar que a atividade hemolítica de *L. monocytogenes* apresenta relação direta com a virulência; portanto, esta característica é duvidosa quando se estabelecer um critério de avaliação de virulência para *L. monocytogenes* (KATHARIOU *et al.*, 1988; MEYER *et al.*, 1992; ROCHE *et al.*, 2001).

Chiu *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 os isolados avaliados destacou-se Scott A, cepa reconhecidamente patogênica e pertencente ao sorotipo 4b, por ter apresentado hemólise fraca assim como baixa atividade da fosfolipase.

Figura 5. Atividade fosfolípida (A), efeito do carvão (B) e atividade hemolítica (C) das cepas de *L. monocytogenes*. A – Ágar BHI + emulsão de gema de ovo, B – Ágar BHI + emulsão de gema de ovo + carvão ativado, C - Ágar Sangue. 1/2B: sorotipo 1/2b (alimento); 1/2C: sorotipo 1/2c (ambiente); 4BENV: sorotipo 4b (ambiente); 4BCLIN, P14, P14A e $\Delta prfA$: sorotipo 4b (sangue).

Com os resultados obtidos no presente estudo pode-se caracterizar fenotipicamente os isolados de *L. monocytogenes*. Observou-se, como já esperado, que a cepa P14A expressa os genes *hly* e *plcB* em ágar sangue e BHI suplementado com lecitina, respectivamente, e que, curiosamente, a cepa 1/2C mostrou o mesmo comportamento, embora mais discreto. Esta última pode apresentar algum tipo de mutação no gene *prfA*, como P14A.

A constante expressão dos fatores de virulência leva ao metabolismo mais lento do microrganismo e conseqüente retardo na sua multiplicação. As características observadas da cepa de origem ambiental 1/2C em relação às curvas de crescimento, com maior duração na fase *lag* (Figura 4), e as atividades hemolítica e fosfolipídica exarcebadas (Figuras 5A e 5C) apresentaram-se correlacionadas entre si.

Todas as cepas de *L. monocytogenes* empregadas neste estudo apresentam o sistema PrfA funcional, uma vez que, suplementando os meios de cultura com carvão ativado, pode-se observar a capacidade fosfolipídica das mesmas.

4.3. Avaliação da capacidade invasiva de cepas de *L. monocytogenes* em células eucarióticas

Os ensaios de invasão não levam em conta os microrganismos que aderem à superfície da célula hospedeira, mas sim aqueles que penetram com sucesso no interior citoplasmático. Por meio da lise celular, pode-se estimar a capacidade de invasão da bactéria em relação ao inóculo inicial.

Para a realização da análise de variância (ANOVA) da capacidade invasiva das cepas de *L. monocytogenes*, os dados obtidos em porcentagem de invasão foram transformados em logaritmos, como pode ser observado nas figuras 6, 7 e 8. Esta transformação já foi utilizada por outros

autores com objetivos similares aos do presente estudo (CHIU *et al.*, 2006; GAILLARD *et al.*, 1987; GARNER *et al.*, 2006).

Como pode ser observado nas figuras 6, 7 e 8, as cepas apresentaram diferentes capacidades de invasão tanto entre si como entre os modelos celulares estudados. Em geral, todos os isolados apresentaram melhor capacidade de invasão em células derivadas de tecido humano (HeLa) (Figura 6), mostrando que a relação bactéria-hospedeiro foi mais específica. A cepa P14A apresentou maior porcentagem de invasão em todos os tipos celulares estudados ($p < 0,05$) (Figuras 6, 7 e 8).

As cepas P14 e 4BCLIN apresentaram comportamentos semelhantes entre si. Esta característica pode ser observada tanto em células epiteliais como em fibroblastos. Já em relação às cepas pertencentes ao sorotipo 1/2 pode-se observar diferentes valores de porcentagem de invasão de acordo com a célula eucariótica utilizada nos experimentos. A cepa 1/2B apresentou a menor capacidade de invasão (0,001%) em células MDBK, porém, em fibroblastos e HeLa as menores porcentagens foram encontradas para 1/2C (0,02% e 0,008%) e 4BENV (0,02% e 0,002%), respectivamente (Figuras 6, 7 e 8).

Os isolados de origem clínica P14 e 4BCLIN e o de origem alimentar 1/2B mostraram maior capacidade invasiva em células HeLa, sendo de 0,07%, 0,2% e 0,1%, respectivamente. Estas cepas foram igualmente invasivas quando comparadas entre si ($p > 0,05$). Convém ressaltar que P14A apresentou o maior índice de invasão (7,4%) para esta linhagem celular (Figura 6).

Figura 6. Box plot da capacidade invasiva de cepas de *L. monocytogenes* em células epiteliais HeLa. A mediana está representada por uma linha horizontal dentro da caixa e a média pelos círculos pretos. Média de três experimentos em duplicata. Para letras iguais não há diferença estatística entre as cepas ($p > 0,05$). 1/2B: sorotipo 1/2b (alimento); 1/2C: sorotipo 1/2c (ambiente); 4BENV: sorotipo 4b (ambiente); 4BCLIN, P14 e P14A: sorotipo 4b (sangue).

Analisando os resultados obtidos com MDBK pode-se verificar que as cepas 1/2C e 4BENV tiveram comportamentos semelhantes, com taxa de invasão de 0,003%, que, estatisticamente, não diferiram da cepa de origem alimentar 1/2B (0,001%) ($p > 0,05$). Os isolados P14 e 4BCLIN mostraram-se igualmente invasivos entre si 0,02%, e 0,03%, respectivamente ($p > 0,05$), porém superiores às demais ($p < 0,05$), enquanto P14A atingiu o maior valor para esta linhagem celular, (1,2%) ($p < 0,05$). Com isso, pode-se observar que as cepas provenientes de alimentos e de ambiente de processamento tiveram baixa capacidade de invasão em MDBK quando comparadas às cepas clínicas (Figura 7).

Figura 7. Box plot da capacidade invasiva de cepas de *L. monocytogenes* em células epiteliais MDBK. A mediana está representada por uma linha horizontal dentro da caixa e a média pelos círculos pretos. Média de dois experimentos em duplicata. Para letras iguais não há diferença estatística entre as cepas ($p > 0,05$). 1/2B: sorotipo 1/2b (alimento); 1/2C: sorotipo 1/2c (ambiente); 4BENV: sorotipo 4b (ambiente); 4BCLIN, P14 e P14A: sorotipo 4b (sangue).

Para os fibroblastos L929, as cepas 1/2B, 1/2C e 4BENV apresentaram 0,04%, 0,008% e 0,002% de invasão. Apesar de neste modelo celular o isolado 1/2B de origem alimentar ter apresentado capacidade de invasão superior a 1/2C e 4BENV, ambas de origem ambiental, estes valores não foram diferentes entre si ($p > 0,05$).

O mesmo ocorreu para a cepa clínica 4BCLIN, que se caracterizou por uma porcentagem de invasão superior a P14 (0,3% e 0,2%, respectivamente), embora estatisticamente não tenha havido diferença entre elas ($p > 0,05$) (Figura 8). Ambos os isolados clínicos mostraram-se mais invasivos que as cepas de origem alimentar e ambiental em fibroblastos L929 ($p < 0,05$).

Figura 8. Box plot da capacidade invasiva de cepas de *L. monocytogenes* em fibroblastos L929. A mediana está representada por uma linha horizontal dentro da caixa e a média pelos círculos pretos. Média de dois experimentos em duplicata. Para letras iguais não há diferença estatística entre as cepas ($p > 0,05$). 1/2B: sorotipo 1/2b (alimento); 1/2C: sorotipo 1/2c (ambiente); 4BENV: sorotipo 4b (ambiente); 4BCLIN, P14 e P14A: sorotipo 4b (sangue).

Pode-se observar que a cepa de origem alimentar 1/2B deste estudo apresentou baixa capacidade invasiva para as linhagens celulares MDBK e L929; porém, em células HeLa, apresentou a mesma capacidade invasiva que as de origem clínica (Figuras 6, 7 e 8).

Os isolados ambientais 1/2C e 4BENV, por sua vez, mostraram ser pouco invasivos, independente da linhagem eucariótica empregada (Figuras 6, 7 e 8).

As cepas clínicas 4BCLIN, P14 e P14A apresentaram maior capacidade de invasão independente do modelo celular estudado, o que pode ser correlacionado com sua fonte de

origem, porém não com o sorotipo, uma vez que 4BENV, de origem ambiental, não apresentou o mesmo comportamento (Figuras 6, 7 e 8).

A etapa de invasão de *L. monocytogenes* é crucial para o início do ciclo de infecção e a deficiência neste processo leva à caracterização da cepa como de potencial patogênico reduzido. Este fenótipo de baixa invasão pode ser decorrente de diferentes fatores, como mutações nas proteínas internalinas e actina A, e características intrínsecas de cada isolado.

L. monocytogenes apresenta diversas estratégias de invasão. Em células Caco-2 foi demonstrado que InlA é a proteína associada à invasão, enquanto que em células Vero, HeLa, Hep-2, fibroblastos e CHO, esta mesma função é mediada por InlB (BRAUN *et al.*, 1998; IRETON *et al.*, 1996; LINGNAU *et al.*, 1995).

Todas as linhagens celulares empregadas neste estudo (HeLa, L929 e MDBK) possuem receptores para InlB, proteína responsável pela diferença verificada na capacidade de invasão das cepas de *L. monocytogenes*, quando comparada aos resultados obtidos com células Caco-2, em outros estudos.

A capacidade de invasão de isolados clínicos foi estudada em diferentes modelos celulares por Monzo *et al.* (2007). Estes autores observaram que as cepas P14 e P14A, as mesmas utilizadas neste estudo, apresentaram 0,3% e 3,5% de invasão, respectivamente, em células HeLa; para células MDBK os valores foram de 0,2% e 2%, enquanto em fibroblastos L929 foram de 0,08% e 5%. A cepa controle *L. innocua* variou de 0,01% a 0,0008%, dependendo da linhagem celular empregada. Estes resultados são semelhantes quando comparados aos obtidos no presente trabalho.

As cepas que apresentaram baixa capacidade invasiva no presente estudo não diferem de outros trabalhos nos quais esta característica já foi descrita. Estes trabalhos também mostraram que a maioria dos isolados, que apresentariam um fenótipo de virulência atenuada, possuía mutações nos genes responsáveis pela transcrição das internalinas. Além disso, foi observado que estes microrganismos eram mais frequentemente isolados de alimentos (JACQUET *et al.*, 2004; JONQUIERES *et al.*, 1998; NIGHTINGALE *et al.*, 2005; OLIER *et al.*, 2002; ROUSSEAU *et al.*, 2004).

Mueller e Freitag (2005) observaram que mutações em *inlA* e *inlB* de cepas de *L. monocytogenes* levaram à redução na capacidade de invasão em células epiteliais humanas em aproximadamente 10 vezes, assim como mutações em *actA* que apresentaram um decréscimo na capacidade de invasão. Esse trabalho demonstra a importância das internalinas, e mesmo da actina A, na etapa de invasão de *L. monocytogenes* para o início do estabelecimento da patogênese.

Roche *et al.* (2005) caracterizaram cepas isoladas de amostras de alimento e clínica em relação à capacidade invasiva em células HT-29, derivadas de carcinoma humano. Estes pesquisadores verificaram que cepas com baixo potencial de virulência apresentaram capacidades invasivas, variando de 0,0001% a 0,001%, e que as cepas virulentas variaram de 0,01% a 1%, não sendo origem ou sorotipo dependente. A porcentagem de invasão de *L. innocua* foi de 0,0003%. Além disso, também puderam observar que estes isolados, considerados de baixa virulência, não apresentaram atividade fosfolipídica decorrente de *plcB*, o que também já havia sido demonstrado por Smith e Portnoy (1993).

Zhou *et al.* (2005) estudaram cepas de *L. monocytogenes* isoladas de diversos alimentos prontos para o consumo na China. Estes pesquisadores verificaram, assim como já demonstrado em outros estudos (NORTON *et al.*, 2001; LARSEN *et al.*, 2002), que os isolados alimentares apresentaram menor capacidade invasiva que os clínicos em células epiteliais Caco-2, resultados estes semelhantes aos apresentados neste estudo para as células epiteliais MDBK e fibroblastos L929.

Recentemente, foi descoberto um novo gene de *L. monocytogenes* envolvido no processo de colonização do fígado e das células intestinais de camundongos. *FbpA* tem a capacidade de aumentar a aderência de *L. monocytogenes* em células Hep-2 na presença de fibronectina. Além disso, *fbpA* atua no nível de expressão de virulência tanto de *hly* como de *inlB*, mas não atua sob *inlA* e *actA* (DRAMSI *et al.*, 2004). Ainda não se demonstrou a influência deste gene em outras linhagens celulares, como as empregadas neste estudo, mas este pode ser um fator adicional na regulação do processo de invasão das cepas de *L. monocytogenes*.

Resultados diferentes aos obtidos neste estudo foram verificados por Chiu *et al.* (2006), utilizando células Caco-2. Estes autores verificaram que tanto cepas pertencentes aos sorotipos 1/2a e 1/2b, de origem alimentar, como 4b, de origem clínica, apresentaram alta capacidade invasiva quando comparadas à *L. innocua*.

Jaradat e Bhunia (2003) estudaram os 13 sorotipos de *L. monocytogenes* com relação a sua capacidade de adesão e invasão em células epiteliais Caco-2. Os resultados sugeriram a divisão dessas cepas em dois grupos, sendo que o grupo I, característico por sua alta capacidade de invasão (variando de 0,14% a 0,32%), compreendeu a maioria das cepas pertencentes aos sorotipos 1/2a, 1/2b e 4b, independente de suas origens.

Ao se comparar os resultados supra-citados com os obtidos no presente estudo, pode-se notar que as cepas de origem alimentar e ambiental apresentaram baixa capacidade invasiva em células epiteliais MDBK e fibroblastos L929 – característica de cepa de baixo potencial de virulência. Esta baixa capacidade de invasão não estabeleceu relação com o sorotipo das cepas.

No entanto, em células epiteliais HeLa, o mesmo comportamento não foi observado em relação à cepa de origem alimentar 1/2B. Sabe-se que todas as linhagens celulares empregadas neste estudo possuem receptores para a proteína InlB, e que, portanto, outros fatores estão influenciando na capacidade invasiva das cepas de *L. monocytogenes* aqui estudadas.

Somente com a avaliação da capacidade invasiva de cepas de *L. monocytogenes* não é possível determinar o potencial patogênico das mesmas. Para isso, ensaios complementares foram realizados e serão descritos posteriormente. Este procedimento também foi adotado por diferentes autores (BUBERT *et al.*, 1999; GAILLARD *et al.*, 1987; GAILLARD *et al.*, 1991; KATHARIOU *et al.*, 1990; KOCKS *et al.*, 1992).

Sumarizando, verificou-se, no presente estudo, que as cepas de *L. monocytogenes* isoladas de casos clínicos (4b) apresentaram, estatisticamente, maior poder de invasão para todas as linhagens celulares estudadas e que a cepa de origem alimentar 1/2B só apresentou alta capacidade de invasão em células epiteliais HeLa.

Apesar das cepas de origem ambiental 1/2C e 4BENV apresentarem baixa capacidade de invasão, não se pode excluir a possibilidade destas cepas causar a doença, uma vez que também deve-se levar em conta o inóculo presente nos alimentos e a multiplicação bacteriana.

4.4. Proliferação intracelular de cepas de *L. monocytogenes* em células eucarióticas

Após os resultados obtidos com os ensaios de invasão, avaliou-se o comportamento das cepas de *L. monocytogenes* quando estas se encontravam no compartimento citoplasmático das células epiteliais. Os experimentos foram realizados em células MDBK e HeLa durante um período máximo de 24 horas.

O cálculo do coeficiente de multiplicação intracelular (IGC) normaliza os valores da população intracitoplasmática a cada tempo determinado, com o respectivo valor obtido no tempo 0 (item 3.2.6), neutralizando, desta forma, o possível impacto das diferenças nas populações iniciais.

Como havia sido constatado (item 4.3) que a cepa P14A apresentava elevada capacidade de invasão, foi utilizada a MOI foi 5 vezes menor que a das outras cepas. Para todos os experimentos a proporção bactéria:célula foi adequada para que em até 24 horas de incubação não ocorresse a lise das células eucarióticas (FRANCIS; THOMAS, 1996).

Analizando a figura 9, nota-se que em células epiteliais HeLa a cepa 4BCLIN atingiu populações elevadas ($1,5 \times 10^7$ UFC/mL), assim como P14A ($2,1 \times 10^7$ UFC/mL) após 24 horas de incubação ($p > 0,05$), fato este relacionado à capacidade de invasão de ambas as cepas.

No geral, as cepas de origem alimentar (1/2B), ambiental (1/2C e 4BENV) e clínica (P14) apresentaram populações intracelulares inferiores quando comparadas às das cepas P14A e 4BCLIN, durante 24 horas de incubação ($p < 0,05$) (Figura 9).

Este comportamento pode ser observado em todos os tempos analisados (0, 4, 8 e 24 horas pós-infecção). Os isolados clínicos 4BCLIN e P14A apresentaram populações superiores em

relação às demais cepas estudadas ($p < 0,05$) e semelhantes entre si ($p > 0,05$) (Figuras 10, 11, 12 e 13). Já a cepa de origem alimentar 1/2B e as de origem ambiental 1/2C e 4BENV apresentaram populações semelhantes à cepa clínica P14 ($p > 0,05$) (Figuras 10, 11, 12 e 13).

Apesar da capacidade de invasão de 4BCLIN ser semelhante à de 1/2B e de P14, em células epiteliais HeLa (Figura 6), o mesmo não ocorreu em relação à proliferação intracelular. Observa-se também que a cepa clínica P14A, que mostrou ser mais invasiva (Figura 6), apresentou populações semelhantes à 4BCLIN.

A partir dos resultados obtidos sobre a população intracelular bacteriana em diferentes intervalos, pode-se concluir que as cepas de origem alimentar e ambiental apresentaram resultados semelhantes à de origem clínica P14 empregada neste estudo, adaptando-se, assim, ao citoplasma da célula eucariótica ($p > 0,05$). Também se observou que a cepa 4BCLIN apresentou proliferação superior à P14, ao longo de 24 horas de incubação, atingindo valores semelhantes à cepa P14A ($p > 0,05$).

Figura 9. Proliferação de cepas de *L. monocytogenes* em células epiteliais HeLa no tempos de 0, 4, 8 e 24 horas pós-infecção. Média de dois experimentos em duplicata representada em escala logarítmica. 1/2B: sorotipo 1/2b (alimento); 1/2C: sorotipo 1/2c (ambiente); 4BENV: sorotipo 4b (ambiente); 4BCLIN, P14 e P14A: sorotipo 4b (sangue).

Figura 10. Proliferação intracelular (UFC/mL) de cepas de *L. monocytogenes* no tempo 0 em células epiteliais HeLa. Média de dois experimentos em duplicata representada em escala logarítmica. Para letras iguais não há diferença estatística entre as cepas ($p > 0,05$). 1/2B: sorotipo 1/2b (alimento); 1/2C: sorotipo 1/2c (ambiente); 4BENV: sorotipo 4b (ambiente); 4BCLIN, P14 e P14A: sorotipo 4b (sangue).

Figura 11. Proliferação intracelular (UFC/mL) de cepas de *L. monocytogenes* em células epiteliais HeLa 4 horas pós-infecção. Média de dois experimentos em duplicata representada em escala logarítmica. Para letras iguais não há diferença estatística entre as cepas ($p>0,05$). 1/2B: sorotipo 1/2b (alimento); 1/2C: sorotipo 1/2c (ambiente); 4BENV: sorotipo 4b (ambiente); 4BCLIN, P14 e P14A: sorotipo 4b (sangue).

Figura 12. Proliferação intracelular (UFC/mL) de cepas de *L. monocytogenes* em células epiteliais HeLa 8 horas pós-infecção. Média de dois experimentos em duplicata representada em escala logarítmica. Para letras iguais não há diferença estatística entre as cepas ($p>0,05$). 1/2B: sorotipo 1/2b (alimento); 1/2C: sorotipo 1/2c (ambiente); 4BENV: sorotipo 4b (ambiente); 4BCLIN, P14 e P14A: sorotipo 4b (sangue).

Figura 13. Proliferação intracelular (UFC/mL) de cepas de *L. monocytogenes* em células epiteliais HeLa 24 horas pós-infecção. Média de dois experimentos em duplicata representada em escala logarítmica. Para letras iguais não há diferença estatística entre as cepas ($p>0,05$). 1/2B: sorotipo 1/2b (alimento); 1/2C: sorotipo 1/2c (ambiente); 4BENV: sorotipo 4b (ambiente); 4BCLIN, P14 e P14A: sorotipo 4b (sangue).

A figura 14 mostra os valores de IGC obtidos para as cepas de *L. monocytogenes* em células epiteliais HeLa durante 24 horas de incubação. Como pode ser observado, todos os isolados estudados apresentaram IGC semelhantes até o tempo de 8 horas pós-infecção ($p>0,05$).

Apesar de estatisticamente todas as cepas apresentarem o mesmo IGC até o período de 8 horas pós-infecção, nota-se que as cepas de origem ambiental 1/2C e 4BENV, que apresentaram baixo poder de invasão em células HeLa (Figura 6), tiveram os maiores IGC após 24 horas de incubação ($p<0,05$) (Figuras 15, 16 e 17). Este resultado explica os obtidos em relação à população intracelular (Figura 9), uma vez que esta se assemelhou às cepas de alta capacidade invasiva (1/2B e P14).

Figura 14. Coeficiente de proliferação intracelular (IGC) de cepas de *L. monocytogenes* em células epiteliais HeLa no tempos de 4, 8 e 24 horas pós-infecção. Média de dois experimentos em duplicata representada em escala logarítmica. 1/2B: sorotipo 1/2b (alimento); 1/2C: sorotipo 1/2c (ambiente); 4BENV: sorotipo 4b (ambiente); 4BCLIN, P14 e P14A: sorotipo 4b (sangue).

Figura 15. Coeficiente de proliferação intracelular (IGC) de cepas de *L. monocytogenes* em células epiteliais HeLa 4 horas pós-infecção. Média de dois experimentos em duplicata representada em escala logarítmica. Para letras iguais não há diferença estatística entre as cepas ($p > 0,05$). 1/2B: sorotipo 1/2b (alimento); 1/2C: sorotipo 1/2c (ambiente); 4BENV: sorotipo 4b (ambiente); 4BCLIN, P14 e P14A: sorotipo 4b (sangue).

Figura 16. Coeficiente de proliferação intracelular (IGC) de cepas de *L. monocytogenes* em células epiteliais HeLa 8 horas pós-infecção. Média de dois experimentos em duplicata representada em escala logarítmica. Para letras iguais não há diferença estatística entre as cepas ($p>0,05$). 1/2B: sorotipo 1/2b (alimento); 1/2C: sorotipo 1/2c (ambiente); 4BENV: sorotipo 4b (ambiente); 4BCLIN, P14 e P14A: sorotipo 4b (sangue).

Figura 17. Coeficiente de proliferação intracelular (IGC) de cepas de *L. monocytogenes* em células epiteliais HeLa 24 horas pós-infecção. Média de dois experimentos em duplicata representada em escala logarítmica. Para letras iguais não há diferença estatística entre as cepas ($p>0,05$). 1/2B: sorotipo 1/2b (alimento); 1/2C: sorotipo 1/2c (ambiente); 4BENV: sorotipo 4b (ambiente); 4BCLIN, P14 e P14A: sorotipo 4b (sangue).

Em células MDBK nota-se que os isolados clínicos 4BCLIN, P14 e P14A apresentaram comportamentos semelhantes em 24 horas pós-infecção. Embora a população de P14A tenha sido superior às demais cepas de origem clínica, não houve diferença estatística ($p>0,05$), com exceção do tempo de 8 horas pós-infecção ($p<0,05$) (Figura 18).

As cepas 1/2B, 1/2C e 4BENV também apresentaram comportamento semelhante entre si para este período ($p>0,05$) (Figura 18).

Em relação ao tempo 0 e 4 horas de incubação, as cepas de origem alimentar (1/2B) e ambiental (1/2C e 4BENV) apresentaram populações intracelulares semelhantes ($p>0,05$). O mesmo ocorreu entre os isolados clínicos (4BCLIN, P14 e P14A) ($p>0,05$) (Figuras 19 e 20).

Os resultados obtidos em 8 horas pós-infecção mostraram que as cepas de origem clínica 4BCLIN, P14 e P14A continuaram a apresentar populações superiores às de origem alimentar e ambiental ($p<0,05$). Somente para este tempo P14A apresentou população diferente e superior às demais cepas clínicas estudadas ($p<0,05$) (Figura 21).

Durante 24 horas de incubação, a proliferação intracelular das cepas de origem ambiental e alimentar foi inferior às cepas de origem clínica ($p<0,05$), porém pode-se notar que a população de 1/2C e 4BENV tende a aproximar-se dos isolados clínicos (Figura 22).

Todas as cepas de *L. monocytogenes* de origem clínica (4BCLIN P14 e P14A) apresentaram elevada população em células MDBK, o que não ocorreu com os experimentos realizados em HeLa, para P14. Já os isolados de origem alimentar e ambiental tiveram o mesmo comportamento em ambas as linhagens celulares empregadas.

Figura 18. Proliferação de cepas de *L. monocytogenes* em células epiteliais MDBK nos tempos de 0, 4, 8 e 24 horas pós-infecção. Média de dois experimentos em duplicata representada em escala logarítmica. 1/2B: sorotipo 1/2b (alimento); 1/2C: sorotipo 1/2c (ambiente); 4BENV: sorotipo 4b (ambiente); 4BCLIN, P14 e P14A: sorotipo 4b (sangue).

Figura 19. Proliferação intracelular (UFC/mL) de cepas de *L. monocytogenes* em células epiteliais MDBK no tempo 0. Média de dois experimentos em duplicata representada em escala logarítmica. Para letras iguais não há diferença estatística entre as cepas ($p > 0,05$). 1/2B: sorotipo 1/2b (alimento); 1/2C: sorotipo 1/2c (ambiente); 4BENV: sorotipo 4b (ambiente); 4BCLIN, P14 e P14A: sorotipo 4b (sangue).

Figura 20. Proliferação intracelular (UFC/mL) de cepas de *L. monocytogenes* em células epiteliais MDBK 4 horas pós-infecção. Média de dois experimentos em duplicata representada em escala logarítmica. Para letras iguais não há diferença estatística entre as cepas ($p>0,05$). 1/2B: sorotipo 1/2b (alimento); 1/2C: sorotipo 1/2c (ambiente); 4BENV: sorotipo 4b (ambiente); 4BCLIN, P14 e P14A: sorotipo 4b (sangue).

Figura 21. Proliferação intracelular (UFC/mL) de cepas de *L. monocytogenes* em células epiteliais MDBK 8 horas pós-infecção. Média de dois experimentos em duplicata representada em escala logarítmica. Para letras iguais não há diferença estatística entre as cepas ($p>0,05$). 1/2B: sorotipo 1/2b (alimento); 1/2C: sorotipo 1/2c (ambiente); 4BENV: sorotipo 4b (ambiente); 4BCLIN, P14 e P14A: sorotipo 4b (sangue).

Figura 22. Proliferação intracelular (UFC/mL) de cepas de *L. monocytogenes* em células epiteliais MDBK 24 horas pós-infecção. Média de dois experimentos em duplicata representada em escala logarítmica. Para letras iguais não há diferença estatística entre as cepas ($p>0,05$). 1/2B: sorotipo 1/2b (alimento); 1/2C: sorotipo 1/2c (ambiente); 4BENV: sorotipo 4b (ambiente); 4BCLIN, P14 e P14A: sorotipo 4b (sangue).

Na figura 23 observa-se que os valores de IGC entre as cepas de *L. monocytogenes* foram semelhantes para os tempos de 4 e 8 horas pós-infecção, com exceção de 4BENV. Para o tempo de 24 horas, a cepa 1/2C apresentou IGC superior às demais, conforme o que já havia sido observado em células HeLa (Figura 17).

A avaliação estatística dos valores de IGC para os tempos de 4 e 8 horas mostrou não haver diferença entre as cepas de origem alimentar 1/2B, a cepa ambiental 1/2C e as cepas clínicas 4BCLIN, P14 e P14A em cada um dos tempos analisados ($p>0,05$) (Figuras 24 e 25).

Observa-se, no entanto, na figura 26, que o valor de IGC para 1/2C foi superior ao das demais cepas ($p<0,05$), e que o isolado 4BENV apresentou o valor de IGC semelhante à cepa de origem alimentar 1/2B e às cepas clínicas ($p>0,05$).

Figura 23. Coeficiente de proliferação intracelular (IGC) de cepas de *L. monocytogenes* em células epiteliais MDBK nos tempos de 4, 8 e 24 horas pós-infecção. Média de dois experimentos em duplicata representada em escala logarítmica. 1/2B: sorotipo 1/2b (alimento); 1/2C: sorotipo 1/2c (ambiente); 4BENV: sorotipo 4b (ambiente); 4BCLIN, P14 e P14A: sorotipo 4b (sangue).

Figura 24. Coeficiente de proliferação intracelular (IGC) de cepas de *L. monocytogenes* em células epiteliais MDBK 4 horas pós-infecção. Média de dois experimentos em duplicata representada em escala logarítmica. Para letras iguais não há diferença estatística entre as cepas ($p > 0,05$). 1/2B: sorotipo 1/2b (alimento); 1/2C: sorotipo 1/2c (ambiente); 4BENV: sorotipo 4b (ambiente); 4BCLIN, P14 e P14A: sorotipo 4b (sangue).

Figura 25. Coeficiente de proliferação intracelular (IGC) de cepas de *L. monocytogenes* em células epiteliais MDBK 8 horas pós-infecção. Média de dois experimentos em duplicata representada em escala logarítmica. Para letras iguais não há diferença estatística entre as cepas ($p > 0,05$). 1/2B: sorotipo 1/2b (alimento); 1/2C: sorotipo 1/2c (ambiente); 4BENV: sorotipo 4b (ambiente); 4BCLIN, P14 e P14A: sorotipo 4b (sangue).

Figura 26. Coeficiente de proliferação intracelular (IGC) de cepas de *L. monocytogenes* em células epiteliais MDBK 24 horas pós-infecção. Média de dois experimentos em duplicata representada em escala logarítmica. Para letras iguais não há diferença estatística entre as cepas ($p > 0,05$). 1/2B: sorotipo 1/2b (alimento); 1/2C: sorotipo 1/2c (ambiente); 4BENV: sorotipo 4b (ambiente); 4BCLIN, P14 e P14A: sorotipo 4b (sangue).

A multiplicação intracelular de *L. monocytogenes* está diretamente relacionada ao escape dos fagossomos. Neste processo, a participação de três proteínas é importante: hly, plcA e plcB. Esta lise é essencial para que a bactéria seja liberada de um meio inóspito (baixo pH e pobre em ferro) para o citoplasma, podendo, assim, se multiplicar e prosseguir com o ciclo de infecção. Dependendo da linhagem celular empregada, a importância destas proteínas é variável. Por exemplo, hly é essencial no escape de fagossomo em macrófagos, porém plcB é suficiente para mediar o escape bacteriano em linhagens epiteliais humanas (GAILLARD *et al.*, 1986; GRUNDLING *et al.*, 2003; KATHARIOU *et al.*, 1987; MARQUIS *et al.*, 1995; PORTNOY *et al.*, 1988).

A constatação, neste estudo, da existência de cepas de *L. monocytogenes* que apresentam baixa capacidade invasiva, atingindo populações intracelulares semelhantes às cepas altamente invasivas, já havia sido observada por Chiu *et al.* (2006). Estes autores, em experimentos de proliferação em células Caco-2, verificaram que algumas cepas de baixa capacidade invasiva, após 19 horas de incubação, apresentaram populações intracelulares semelhantes às cepas consideradas altamente invasivas. Resultados semelhantes também foram encontrados por Sokolovic *et al.* (1996), que sugerem que esta maior proliferação seja decorrente de eficiente escape do fagossomo e rápida disseminação.

O mecanismo de escape de cepas de *L. monocytogenes* dos fagossomos de células MDBK ainda não foi descrito. Acredita-se que ocorra a participação de hemolisina e/ou fosfolipases, por tratar-se de uma linhagem epitelial.

Estudos que tenham empregado o IGC para avaliar a capacidade de proliferação intracelular de cepas de *L. monocytogenes* não foram encontrados na literatura. No presente trabalho

demonstra-se a importância da determinação deste parâmetro para avaliar a dinâmica da multiplicação bacteriana, que pode ser erroneamente interpretada se for utilizada somente a determinação da população intracelular.

Vale ressaltar que a cepa de origem ambiental 1/2C, que já havia demonstrado, em experimentos com meio de cultura, alta atividade hemolítica e fosfolipídica (Figuras 5A e 5C), apresentou maiores valores de IGC tanto em células HeLa como MDBK (Figuras 17 e 26), embora o mesmo não tenha sido constatado para a cepa mutante P14A.

Os baixos valores de IGC encontrados para as cepas P14A e 4BCLIN podem estar relacionados ao possível efeito citotóxico destes isolados sobre as células eucarióticas HeLa e MDBK (Figuras 14 e 23), uma vez que populações elevadas no citoplasma eucariótico podem levar à lise das células, deixando, assim, as bactérias susceptíveis à ação da gentamicina, presente no meio de cultura empregado no ensaio.

Estas informações complementam os ensaios de invasão discutidos anteriormente. Os experimentos de proliferação mostram que os isolados ambientais, apesar do baixo poder de invasão, apresentam IGC superiores aos isolados clínicos. A cepa de origem alimentar 1/2B também apresentou comportamento semelhante aos isolados clínicos.

Em células HeLa, a maior capacidade invasiva das cepas 4BCLIN e P14A (Figura 6) levou à elevada população intracelular durante 24 horas de incubação. Para as cepas 1/2B e P14, que também haviam apresentado porcentagens de invasão semelhantes à cepa 4BCLIN (Figura 6), o mesmo não foi observado.

A característica invasiva, portanto, não é, somente, o único parâmetro que influencia na proliferação intracelular, embora seja importante. Em células MDBK, todas as cepas consideradas altamente invasivas tiveram uma população intracelular superior.

As diferenças encontradas neste estudo com relação à capacidade de proliferação das cepas de *L. monocytogenes* podem estar relacionadas com as proteínas envolvidas na etapa de escape do fagossomo, já que a multiplicação microbiana ocorre dentro do compartimento citoplasmático e não do vacúolo.

Este comportamento pode estar relacionado, portanto, às proteínas implicadas em cada etapa do ciclo de infecção. Enquanto a proteína internalina é responsável pela invasão, as fosfolipases e a hemolisina atuam no processo de proliferação intracelular. A regulação e transcrição dos genes de virulência destas proteínas mostram ser distintas entre as cepas, baseando-se nos resultados obtidos nestes ensaios.

Além disso, as cepas que apresentaram alto IGC podem estar utilizando com maior eficiência os substratos (fontes de carbono) encontrados no citoplasma da célula hospedeira, por meio da proteína transportadora de hexose fosfatada (hpt), já descrita para *L. monocytogenes*.

Sendo assim, cepas que apresentam fenótipo de baixa invasão não devem ser consideradas de baixo potencial patogênico, em um primeiro momento, e o comportamento intracelular deve ser avaliado para se poder inferir qualquer característica em relação à sua virulência.

A alta taxa de multiplicação é um fator importante tanto no alimento como no hospedeiro. Um alto inóculo bacteriano presente no alimento aumentaria as chances de desenvolver a doença,

ou, se este inóculo for baixo, uma vez em contato com indivíduo imunodeprimido, a proliferação ocorreria rapidamente.

As populações bacterianas intracelulares (UFC/mL) foram superiores em células HeLa, quando comparados os resultados obtidos em células MDBK para todas as cepas de *L. monocytogenes* estudadas (Figuras 9 e 18). Também já havia sido demonstrado que a capacidade invasiva das cepas de *L. monocytogenes* foi superior em células epiteliais humanas (HeLa), mostrando, assim, melhor adaptação dos isolados à esta linhagem celular (Figuras 6 e 7).

Verificou-se, portanto, que para a multiplicação intracelular, as características intrínsecas dos isolados, e também das linhagens celulares empregadas, influenciam no comportamento observado nas cepas. Portanto, se estas cepas conseguirem atravessar as barreiras do hospedeiro poderão vir a estabelecer o ciclo de infecção.

4.5. Disseminação intercelular de cepas de *L. monocytogenes* em células eucarióticas

Fibroblastos murinos L2 e L929 têm sido tradicionalmente empregados como modelo celular para ensaios de formação de placas de lise (GLOMSKI *et al.*, 2003; GRAY *et al.*, 2004; NORTON *et al.*, 2001; SUN *et al.*, 1990), porém, outros estudos, visando avaliar a heterogeneidade de virulência de cepas de *L. monocytogenes*, utilizaram diferentes linhagens celulares, como Caco-2 e HT-29 (GUDMUNSDOTTIR *et al.*, 2006; ROBERTS *et al.*, 2005; ROCHE *et al.*, 2001; ROCHE *et al.*, 2005; VAN LANGENDONCK *et al.*, 1998). Neste estudo decidiu-se utilizar, além dos fibroblastos L929, as linhagens celulares epiteliais HeLa e MDBK, com as quais foram realizados experimentos de invasão e proliferação.

Este ensaio pode ser analisado por dois diferentes aspectos: em relação ao tamanho das placas formadas e em relação às quantidades das mesmas. O tamanho da placa de lise, ou halo, indica a capacidade da bactéria disseminar-se de célula para célula. Os halos formados são as células eucarióticas mortas, após a invasão, multiplicação e disseminação do patógeno. Em relação ao número de placas de lise, este está diretamente relacionado à capacidade invasiva da bactéria. Quanto maior o número de placas de lise formadas, maior o número de células infectadas (ROBERTS *et al.*, 2005).

Para certificar-se de que esta propriedade de formação das placas de lise está correlacionada com a disseminação intercelular e conseqüente atuação de *actA*, em todos os experimentos, um orifício foi usado como controle negativo. Neste, as células foram infectadas com a cepa *L. monocytogenes* $\Delta actA$. Em um outro orifício havia somente células eucarióticas não infectadas – e este era utilizado para verificar se a linhagem celular apresentava intrinsecamente a capacidade de formação de placas de lise.

Na figura 27 pode-se observar a formação de placas de lise na linhagem celular L929, que apresentou halos homogêneos e distintos, facilitando a leitura dos resultados.

O isolado alimentar 1/2B foi responsável pelo menor diâmetro médio dos halos formados (0,052mm), o que representa 40% do tamanho das placas de lise produzidas por P14A (0,125mm) (Figura 28). As cepas de origem clínica 4BCLIN e P14 também induziram a formação de pequenas placas de lise, com diâmetros médios de 0,075mm a 0,092mm, respectivamente. A cepa 4BCLIN e a de origem alimentar apresentaram a mesma capacidade de disseminação intercelular ($p > 0,05$) (Figura 28).

As cepas ambientais, 1/2C e 4BENV, foram capazes de produzir maiores placas de lise, atingindo diâmetros médios de 0,112mm e 0,105mm, respectivamente, não diferindo de P14 e P14A ($p>0,05$) (Figura 28).

Pode-se observar também que a cepa de origem ambiental 4BENV apresentou menor número de halos (Figura 27), correlacionado à sua baixa capacidade de invasão em fibroblastos L929 (Figura 8). Já para a cepa 1/2C, que também não mostrou elevada capacidade invasiva nesta linhagem celular, essa característica não pode ser observada.

O ensaio de formação em placas de lise, apesar de também possibilitar a avaliação da capacidade invasiva de cepas de *L. monocytogenes* (ROBERTS *et al.*, 2005), é preferencialmente empregado para o estudo de disseminação bacteriana. Os ensaios de invasão, previamente descritos, apresentarem-se mais eficazes para a análise desta característica, assim como já demonstrado em outros trabalhos (GUDMUNDSDOTTIR *et al.*, 2006; ROCHE *et al.*, 2001; ROCHE *et al.*, 2005).

Nas figuras 29 e 30, observa-se a formação de placas de lise em células MDBK. Nota-se que a variação existente entre o tamanho dos halos foi muito pequena, não se verificando relação com a fonte de origem ou o sorotipo dos isolados ($p>0,05$).

A cepa P14A levou à formação de placas de lise maiores com diâmetros médios dos halos formados de 0,14mm. Apesar deste valor ser superior aos obtidos pelas demais cepas em estudo, que variaram entre 0,098mm e 0,112mm, todas apresentaram a mesma capacidade de disseminação em células MDBK ($p>0,05$) (Figura 30).

Figura 27. Formação de placas de lise em fibroblastos L929 por cepas de *L. monocytogenes* coradas com vermelho neutro após 72 horas de incubação. Resultado representativo de um experimento. 1/2B: sorotipo 1/2b (alimento); 1/2C: sorotipo 1/2c (ambiente); 4BENV: sorotipo 4b (ambiente); 4BCLIN, P14 e P14A: sorotipo 4b (sangue).

Figura 28. Diâmetros dos halos de lise formados (mm) em fibroblastos L929 por cepas *L. monocytogenes* após 72 horas de incubação. Média de três experimentos em duplicata. Para letras iguais não há diferença estatística entre as cepas ($p > 0,05$). 1/2B: sorotipo 1/2b (alimento); 1/2C: sorotipo 1/2c (ambiente); 4BENV: sorotipo 4b (ambiente); 4BCLIN, P14 e P14A: sorotipo 4b (sangue).

Figura 29. Formação de placas de lise em células epiteliais MDBK por cepas de *L. monocytogenes* coradas com vermelho neutro após 72 horas de incubação. Resultado representativo de um experimento. 1/2B: sorotipo 1/2b (alimento); 1/2C: sorotipo 1/2c (ambiente); 4BENV: sorotipo 4b (ambiente); 4BCLIN, P14 e P14A: sorotipo 4b (sangue).

Figura 30. Diâmetros dos halos de lise formados (mm) em células epiteliais MDBK por cepas *L. monocytogenes* após 72 horas de incubação. Média de dois experimentos em duplicata. Para letras iguais não há diferença estatística entre as cepas ($p > 0,05$). 1/2B: sorotipo 1/2b (alimento); 1/2C: sorotipo 1/2c (ambiente); 4BENV: sorotipo 4b (ambiente); 4BCLIN, P14 e P14A: sorotipo 4b (sangue).

O número de placas de lise formado em MDBK foi inferior para as cepas P14 e 1/2B (Figura 29). Assim como já foi relatado para este mesmo ensaio utilizando fibroblastos L929, estes resultados não corresponderam aos obtidos com os experimentos de invasão em células MDBK para a cepa P14 (Figura 7). As cepas de origem ambiental 1/2C e 4BENV, que apresentaram baixa capacidade invasiva, formaram elevado número de halos, semelhantes à cepa P14A, altamente invasiva, em células MDBK (Figura 29).

Os resultados em HeLa mostram também maior afinidade das cepas empregadas com esta linhagem celular, por formarem os maiores halos em relação às demais células eucarióticas utilizadas para este mesmo ensaio. Esta característica já havia sido observada nos ensaios de invasão (Figura 6) e proliferação (Figura 9).

Em relação ao tamanho das placas de lise, todos os isolados tiveram comportamentos semelhantes entre si, com diâmetros médios variando de 0,08mm a 0,125mm, indicando a mesma capacidade de disseminação nesta linhagem celular ($p>0,05$) (Figura 32).

Figura 31. Formação de placas de lise em células epiteliais HeLa por cepas de *L. monocytogenes* coradas com vermelho neutro após 72 horas de incubação. Resultado representativo de um experimento. 1/2B: sorotipo 1/2b (alimento); 1/2C: sorotipo 1/2c (ambiente); 4BENV: sorotipo 4b (ambiente); 4BCLIN, P14 e P14A: sorotipo 4b (sangue).

Figura 32. Diâmetros dos halos de lise formados (mm) em células epiteliais HeLa por cepas *L. monocytogenes* após 72 horas de incubação. Média de dois experimentos em duplicata. Para letras iguais não há diferença estatística entre as cepas ($p > 0,05$). 1/2B: sorotipo 1/2b (alimento); 1/2C: sorotipo 1/2c (ambiente); 4BENV: sorotipo 4b (ambiente); 4BCLIN, P14 e P14A: sorotipo 4b (sangue).

É importante, no entanto, empregar as mesmas linhagens celulares para o estudo de diferentes características relacionadas ao aspecto de virulência de *L. monocytogenes*. Cada modelo celular apresenta características distintas entre si, o que pode influenciar no comportamento das cepas. Até o momento, porém, os pesquisadores realizam os experimentos relacionados à invasão e proliferação em células epiteliais, hepatócitos ou macrófagos, e o ensaio de disseminação intercelular, por meio da formação de placas de lise, em fibroblastos.

A sensibilidade do ensaio de formação de placas de lise, para a avaliação da capacidade invasiva, não foi satisfatória, tanto em fibroblastos L929 quanto em células epiteliais HeLa e MDBK, explicitando a limitação desta metodologia.

Pode-se observar, pelos resultados obtidos no ensaio de formação de placas de lise, a importância de se avaliar o comportamento dos microrganismos em diferentes linhagens celulares, tanto de origem animal quanto humana. Enquanto fibroblastos murinos L929 indicaram diferença na disseminação intercelular entre as cepas avaliadas, o mesmo não foi observado em células epiteliais HeLa e MDBK. No entanto, os fibroblastos L929 ou L2 foram as células de escolha, até o momento, pela maioria dos pesquisadores, por apresentarem uma boa correlação com os ensaios de disseminação realizados *in vivo*.

O ensaio de disseminação intercelular em células HeLa é importante, já que é uma linhagem cervical humana e que *L. monocytogenes* é capaz de atravessar a barreira placentária, causando aborto e nascimento prematuro de fetos. O quadro clínico dos fetos caracteriza-se por meningite ou septicemia.

Neste estudo observou-se que o isolado 1/2B levou à formação de halos de tamanho pequeno em fibroblastos L929, assim como 4BCLIN, podendo indicar uma mutação no gene *hly*,

conforme verificado por Sun *et al.* (1990) empregando fibroblastos L2. Estas cepas também apresentaram baixos valores de IGC, em células HeLa e MDBK, o que reforça uma possível alteração neste gene.

Esta característica não foi observada nos experimentos de disseminação realizados em células HeLa e MDBK, indicando que, nestas células, o escape bacteriano do fagossomo secundário seja mediado principalmente por fosfolipase B.

Roche *et al.* (2005), realizando este mesmo ensaio, porém com células humanas HT-29, observaram que todas as cepas de *L. monocytogenes* isoladas de alimentos e ambientes de processamento (sorotipos 1/2a, 1/2c e 4b) avaliadas e duas cepas de origem clínica (4b) somente induziram a pequenas placas de lise. Estas cepas apresentaram atividade hemolítica característica desta espécie, porém, 50% destas não mostraram atividade fosfolipídica.

Estes resultados, no entanto, não excluem o potencial patogênico destas cepas. Gudmundsdottir *et al.* (2006), estudando a virulência de cepas de *L. monocytogenes*, tanto isoladas de uma linha de processamento de frutos-do-mar como de origem clínica, em células HT-29, observaram a formação de pequenas placas de lise por algumas cepas pertencentes a ambas as origens. Estes mesmos isolados, quando utilizados em experimentos de inoculação intragástrica em camundongos, demonstraram-se virulentos, baseando-se na dose letal.

Já as cepas ambientais 1/2C e 4BENV, que formaram grandes halos de lise em fibroblastos L929, apresentaram elevados valores de IGC, em células HeLa e MDBK (para a cepa 1/2C), demonstrando alta eficiência na etapa de escape.

O isolado clínico 4BCLIN empregado neste estudo pode ter apresentado halos de tamanho inferior em relação às cepas ambientais devido à maior citotoxicidade destes aos fibroblastos, como já demonstrado por Glomski *et al.* (2003). Estes autores verificaram que cepas consideradas citotóxicas em ensaios *in vivo* levaram à formação de pequenas placas de lise em fibroblastos L2, sugerindo a destruição da célula eucariótica antes mesmo do início da disseminação intercelular. Nos ensaios *in vitro*, estas bactérias liberadas ficariam sujeitas à ação da gentamicina.

Uma limitação deste ensaio utilizando a linhagem celular L929 seria, portanto, a avaliação da disseminação de cepas citotóxicas, já que o resultado seria interpretado erroneamente, caso ensaios complementares não fossem realizados. A influência da citotoxicidade dos isolados de *L. monocytogenes* não foi observada nos ensaios de formação de placas de lise com células HeLa e MDBK, o que reforça, mais uma vez, a necessidade de utilização de outros modelos celulares para estes experimentos.

Em contraposição aos resultados obtidos em outros trabalhos, as cepas ambientais deste estudo apresentaram halos maiores que a cepa de origem clínica 4BCLIN para a linhagem L929. Gray *et al.* (2004) avaliaram cepas de *L. monocytogenes* de origem alimentar e clínica em relação a sua virulência por meio de ensaios de formação de placas de lise e infecção em camundongos. As cepas clínicas apresentaram valores superiores, em média, além de mostraram-se mais citopatogênicas nos ensaios *in vivo*. Resultados semelhantes também foram obtidos por Wiedmann *et al.* (1997). Em ambos os trabalhos a linhagem celular utilizada foi fibroblastos L2.

Em um único trabalho empregando células epiteliais Caco-2 para o ensaio de formação de placas (VAN LANGENDONCK *et al.*, 1998), observou-se que isolados clínicos (sorotipos 1/2a,

1/2b e 4b) formaram halos de tamanho semelhante aos de isolados ambientais e alimentares (sorotipos 1/2a e 1/2c), mostrando não haver diferenças entre sorotipos e origem das cepas. No presente trabalho também se constatou esta mesma característica entre as cepas de *L. monocytogenes* estudadas para resultados obtidos com células epiteliais HeLa e MDBK.

O ensaio de formação de placas em fibroblastos L929 permitiu a discriminação entre algumas cepas de *L. monocytogenes* neste estudo, apresentando também alta reprodutibilidade e sensibilidade. No entanto, os resultados demoram a ser produzidos (5 dias) e somente mostram-se diferenciais em algumas linhagens celulares, como as aqui apresentadas. Além disso, este tipo de ensaio não se mostra sensível quando os isolados estudados apresentam reduzido potencial patogênico (ROBERTS, *et al.*, 2005), devendo-se, desta forma, se levar em conta outras características das cepas.

Com os resultados obtidos para fibroblastos L929, foi possível confirmar o potencial patogênico das cepas de origem ambiental, já observado nos ensaios de proliferação. Isto ratifica a necessidade do empregar diferentes ensaios na avaliação da patogenicidade de cepas de *L. monocytogenes*, sendo o ensaio de formação de placas de lise uma ferramenta útil para esta caracterização.

4.6. Avaliação da citotoxicidade de cepas de *L. monocytogenes* às células eucarióticas

L. monocytogenes mostra-se citotóxica às células que colonizam. Porém, esta citotoxicidade não é favorável ao desenvolvimento do ciclo de infecção, uma vez que, ao lisar as células do hospedeiro o patógeno fica vulnerável à ação de fatores externos do organismo, que busca, de todas as maneiras, eliminá-lo. Por outro lado, a capacidade citotóxica às células envolvidas na resposta imunológica favorece a permanência e sucesso da infecção pelo patógeno. Esta

propriedade já foi demonstrada em linfócitos B murinos infectados por cepas de *L. monocytogenes* (MENON *et al.*, 2003). A partir dessas informações pode-se supor que, dependendo da célula infectada, a resposta, em relação à citotoxicidade, pode ser diferente.

A utilização de incubação por até 24 horas (neste estudo) foi necessária para que se pudesse avaliar a citotoxicidade das cepas estudadas. Sabe-se que para este tipo de estudo o período de 24 horas é considerado muito longo, pois podem ocorrer danos à célula eucariótica. Entretanto, avaliações microscópicas realizadas entre as determinações de LDH e morte celular garantiram que estas células estavam em condições experimentais, o que foi verificado pela viabilidade celular, por meio de *trypan blue*.

4.6.1. Liberação da enzima lactato desidrogenase (LDH) por células eucarióticas infectadas com cepas de *L. monocytogenes*

O ensaio de citotoxicidade baseado na quantificação de LDH, por espectrofotometria, liberada pelas células eucarióticas infectadas, tem sido utilizado com sucesso para se avaliar citopatogenicidade de cepas de *L. monocytogenes* (BHUNIA *et al.*, 1994; MENON *et al.*, 2003).

Como controle nestes experimentos, foram realizadas as determinações de LDH em células eucarióticas não infectadas para avaliar qual o valor de liberação basal (*background*) desta enzima no período de 0-24 horas de infecção.

A figura 33 mostra os níveis de LDH liberados pelas células HeLa 8 horas pós-infecção por cepas de *L. monocytogenes*, assim como o controle. Como pode ser observado, os níveis de liberação da enzima mantiveram-se estáveis até este período ($p > 0,05$) e inferiores aos dos obtidos com o controle ($p < 0,05$).

O quadro alterou-se 24 horas pós-infecção, como pode ser observado na figura 34. As cepas de origem clínica 4BCLIN e P14A induziram, significativamente, o aumento da liberação de LDH pelas células HeLa, sendo este cerca de três vezes maior em relação ao tempo de 8 horas. Estes valores foram diferentes daqueles obtidos pelas demais cepas e pelo controle ($p < 0,05$).

A cepa de origem alimentar (1/2B), ambiental (1/2C e 4BENV) e a cepa clínica (P14) não difeririam em relação ao LDH quando comparadas ao controle ($p > 0,05$), mantendo-se praticamente estáveis durante todos os períodos de incubação analisados (Figuras 33 e 34).

Figura 33. Liberação de enzima lactato desidrogenase (LDH) por células epiteliais HeLa 8 horas pós-infecção com cepas de *L. monocytogenes*. Média de dois experimentos em duplicata. Para letras iguais não há diferença estatística entre as cepas ($p > 0,05$). 1/2B: sorotipo 1/2b (alimento); 1/2C: sorotipo 1/2c (ambiente); 4BENV: sorotipo 4b (ambiente); 4BCLIN, P14 e P14A: sorotipo 4b (sangue).

Figura 34. Liberação de enzima lactato desidrogenase (LDH) por células epiteliais HeLa 24 horas pós-infecção com cepas de *L. monocytogenes*. Média de dois experimentos em duplicata. Para letras iguais não há diferença estatística entre as cepas ($p>0,05$). 1/2B: sorotipo 1/2b (alimento); 1/2C: sorotipo 1/2c (ambiente); 4BENV: sorotipo 4b (ambiente); 4BCLIN, P14 e P14A: sorotipo 4b (sangue).

Os resultados obtidos para P14A e 4BCLIN estão diretamente relacionados à sua capacidade de proliferação no citoplasma das células eucarióticas, ou seja, maior população em 24 horas pós-infecção (Figura 9), mostrando-se, assim, citotóxicas às células HeLa.

A cepa de origem clínica 4BCLIN, que induziu a elevada liberação de LDH em células HeLa, havia apresentado pequenos halos nos ensaios de formação de placas de lise realizados com fibroblastos L929. Os dados agora apresentados reafirmam a hipótese levantada no item 4.5, com relação à citotoxicidade desta cepa.

Analisando a figura 35, observa-se que a liberação de LDH por células MDBK apresentou um quadro semelhante ao das células HeLa para o período de 8 horas pós-infecção. A liberação de LDH, tanto por células infectadas, como pelo controle, foi semelhante ($p>0,05$).

Após 24 horas de infecção, para as células MDBK, não houve aumento na liberação de LDH pelas células infectadas, sendo esta liberação semelhante a do controle ($p>0,05$) (Figura 36). Para os ensaios de proliferação intracelular em células MDBK já havia sido relatado que as populações bacterianas de todas as cepas foram inferiores, se comparados com os resultados obtidos para as células HeLa (Figuras 9 e 18).

Os resultados obtidos para as linhagens celulares HeLa e MDBK indicam que as cepas de origem ambiental (1/2C e 4BENV), a cepa de origem alimentar (1/2B) e a cepa clínica (P14) não foram citotóxicas para as células eucarióticas no tempo de 8 horas pós-infecção.

Para o tempo de 24 horas pós-infecção, observou-se que as cepas P14A e 4BCLIN foram citotóxicas às células HeLa, mas não para as células MDBK.

Figura 35. Liberação de enzima lactato desidrogenase (LDH) por células epiteliais MDBK 8 horas pós-infecção com cepas de *L. monocytogenes*. Média de dois experimentos em duplicata. Para letras iguais não há diferença estatística entre as cepas ($p>0,05$). 1/2B: sorotipo 1/2b (alimento); 1/2C: sorotipo 1/2c (ambiente); 4BENV: sorotipo 4b (ambiente); 4BCLIN, P14 e P14A: sorotipo 4b (sangue).

Figura 36. Liberação de enzima lactato desidrogenase (LDH) por células epiteliais MDBK 24 horas pós-infecção com cepas de *L. monocytogenes*. Média de dois experimentos em duplicata. Para letras iguais não há diferença estatística entre as cepas ($p > 0,05$). 1/2B: sorotipo 1/2b (alimento); 1/2C: sorotipo 1/2c (ambiente); 4BENV: sorotipo 4b (ambiente); 4BCLIN, P14 e P14A: sorotipo 4b (sangue).

Embora o efeito citotóxico das cepas 4BCLIN e P14A só tenha sido observado em células HeLa após 24 horas de incubação, outros trabalhos demonstraram que cepas de *L. monocytogenes* podem ser citotóxicas em tempos menores (BHUNIA *et al.*, 1994; MENON *et al.* 2003). A liberação de LDH por timócitos murinos e humanos após infecção por cepas de *L. monocytogenes* foi observada em um intervalo de 6 a 8 horas de incubação.

Estes autores, entretanto, realizaram experimentos em linhagens celulares envolvidas na resposta imune do hospedeiro, e o rápido efeito citotóxico encontrado pode estar relacionado ao mecanismo de defesa de *L. monocytogenes*, já que esta tem como principal propriedade disseminar-se e somente permanecer em células que permitam a sua proliferação.

Algumas cepas deste estudo induziram liberação de LDH inferior ao valor basal encontrado para as linhagens celulares estudadas (Figura 33). Estes resultados também já foram descritos por

Barsig e Kaufmann (1997) e por Roberts *et al.* (2005), em macrófagos murinos, com cepas de *L. monocytogenes* que apresentavam mutação no gene *hly*.

A hemolisina está envolvida no processo de citotoxicidade de cepas de *L. monocytogenes*. Observa-se que cepas que apresentaram características sugestivas de mutação no gene *hly* (1/2B e P14) em ensaios anteriormente descritos (proliferação e disseminação) também não se mostraram citotóxicas às células eucarióticas estudadas.

Pode-se observar que a cepa 1/2C de *L. monocytogenes*, deste estudo, que apresentou atividade hemolítica superior às demais cepas, em placas de ágar sangue (Figura 5), não demonstrou alta citotoxicidade em modelos celulares. Esta maior capacidade de produção de hemolisina, avaliada em meio de cultura, não conferiu uma vantagem adicional à bactéria quando internalizada nas células eucarióticas. Este fato pode ser decorrente da ativação do sistema PrfA, de maneira equilivalente para todas as bactérias que encontram-se no citoplasma de células eucarióticas. A regulação e transcrição de *prfA* leva à expressão de todos os fatores envolvidos no ciclo de infecção de *L. monocytogenes*, e as proteínas transcritas frente a este estímulo (PrfA) só não são atuantes caso os seus respectivos genes apresentem algum tipo de mutação.

Apesar das cepas ambientais 1/2C e 4ENV não serem citotóxicas às células eucarióticas avaliadas neste estudo, estas apresentam características importantes para o desenvolvimento do ciclo de infecção de *L. monocytogenes*: elevada taxa de proliferação (IGC) (Figuras 14 e 23) e alta capacidade de disseminação (Figuras 30 e 32), representando, assim, risco à saúde, se presentes nos alimentos.

4.6.2. Morte celular de células eucarióticas infectadas por cepas de *L. monocytogenes*

O método utilizado neste estudo para a avaliação da morte celular baseia-se na alteração da membrana citoplasmática. Em células apoptóticas, a translocação da fosfatidilserina da parte interna da membrana para o exterior é detectada pela anexina V, que possui alta afinidade por este fosfolípido. A anexina V está conjugada com FITC, substância fluorescente. Já em células necróticas, a formação de poros na membrana plasmática permite a entrada do iodeto de propídeo (IP), corando a célula (VAN ENGELAND *et al.*, 1998).

Neste estudo, os experimentos realizados para caracterizar as células epiteliais HeLa e MDBK em relação a sua viabilidade celular, após serem infectadas com cepas de *L. monocytogenes*, foram submetidos a citometria de fluxo, pela qual informações sobre porcentagens de células normais, apoptóticas, apoptóticas tardias e necróticas puderam ser avaliadas.

Durante o experimento também se utilizou, como controle, células eucarióticas não infectadas. Como indutor de apoptose empregou-se a toxina estaurosporina (STS), que apresentou resultados variando de 15% a 20% de células apoptóticas.

Nas figuras 37 a 40 estão apresentados os dados de viabilidade celular de células eucarióticas HeLa após infecção com cepas de *L. monocytogenes* nos tempos de 8 e 24 horas de incubação. Nestas figuras encontram-se as populações de células em processo apoptótico (Figuras 37 e 39) e necrótico (Figuras 38 e 40).

Figura 37. Porcentagens de células epiteliais HeLa Anexina V⁺, características do processo apoptótico, 8 horas pós-infecção com cepas de *L. monocytogenes*, determinadas por citometria de fluxo. Média de dois experimentos em duplicata. Para letras iguais não há diferença estatística entre as cepas ($p > 0,05$). 1/2B: sorotipo 1/2b (alimento); 1/2C: sorotipo 1/2c (ambiente); 4BENV: sorotipo 4b (ambiente); 4BCLIN, P14 e P14A: sorotipo 4b (sangue).

Figura 38. Porcentagens de células epiteliais HeLa IP⁺, características do processo necrótico, 8 horas pós-infecção com cepas de *L. monocytogenes*, determinadas por citometria de fluxo. Média de dois experimentos em duplicata. Para letras iguais não há diferença estatística entre as cepas ($p > 0,05$). 1/2B: sorotipo 1/2b (alimento); 1/2C: sorotipo 1/2c (ambiente); 4BENV: sorotipo 4b (ambiente); 4BCLIN, P14 e P14A: sorotipo 4b (sangue).

Após a infecção de células HeLa por cepas de *L. monocytogenes*, em um intervalo de 8 horas, não foi observada indução ao processo apoptótico pelas cepas, já que os valores obtidos foram semelhantes ao controle ($p>0,05$) (Figura 37). A porcentagem de células apoptóticas variou de 4% a 7%.

Em relação ao processo necrótico, verificou-se que a cepa P14A induziu a 10% de necrose celular. Já os isolados 1/2C, 1/2B, 4BCLIN e P14 levaram à necrose de 2% a 7% do total de células, em 8 horas pós-infecção. No entanto, somente a cepa P14A apresentou valores diferentes aos do controle, induzindo, portanto, ao processo necrótico ($p<0,05$) (Figura 38).

Os resultados obtidos em relação à indução apoptótica após 24 horas de incubação foram semelhantes aos obtidos no intervalo de 8 horas. As porcentagens de células apoptóticas não apresentaram diferenças, em relação ao controle, independente da cepa de *L. monocytogenes* utilizada para a infecção (Figura 39). Estes resultados indicam que nenhuma das cepas foi capaz de induzir apoptose ($p>0,05$) (Figura 39).

Os isolados P14A e 4BCLIN levaram à necrose de células HeLa em 24 horas pós-infecção, indicada pela diferença existente com relação ao controle, atingindo porcentagens de 25% de células necróticas ($p<0,05$) (Figura 40). Estes dados podem ser correlacionados com os obtidos nos experimentos de citotoxicidade pela liberação de LDH (Figura 34) e também com os ensaios de proliferação (Figura 9). Observa-se que para estas cepas existe estreita correlação entre população intracelular e citotoxicidade. As cepas de origem alimentar 1/2B, ambiental 1/2C e 4BENV e clínica P14 não apresentaram resultados estatisticamente diferentes ao controle, em 24 horas pós-infecção ($p>0,05$) (Figura 40).

Figura 39. Porcentagens de células epiteliais HeLa Anexina V⁺, características do processo apoptótico, 24 horas pós-infecção com cepas de *L. monocytogenes*, determinadas por citometria de fluxo. Média de dois experimentos em duplicata. Para letras iguais não há diferença estatística entre as cepas ($p > 0,05$). 1/2B: sorotipo 1/2b (alimento); 1/2C: sorotipo 1/2c (ambiente); 4BENV: sorotipo 4b (ambiente); 4BCLIN, P14 e P14A: sorotipo 4b (sangue).

Figura 40. Porcentagens de células epiteliais HeLa PI⁺, características do processo necrótico, 24 horas pós-infecção com cepas de *L. monocytogenes*, determinadas por citometria de fluxo. Média de dois experimentos em duplicata. Para letras iguais não há diferença estatística entre as cepas ($p > 0,05$). 1/2B: sorotipo 1/2b (alimento); 1/2C: sorotipo 1/2c (ambiente); 4BENV: sorotipo 4b (ambiente); 4BCLIN, P14 e P14A: sorotipo 4b (sangue).

A cepa P14A foi responsável pela necrose em células HeLa tanto em 8 como 24 horas pós-infecção. Já a cepa de origem clínica 4BCLIN induziu à necrose de células HeLa no maior tempo de incubação estudado, com resultados semelhantes à liberação de LDH para esta mesma linhagem celular e neste mesmo período (Figura 34).

Analisando a viabilidade celular de MDBK após 8 horas de incubação com cepas de *L. monocytogenes* não se observou indução apoptótica ou necrótica pelas bactérias ($p>0,05$). A porcentagem de células apoptóticas variou de 4,5% a 7% e de células necróticas de 2% a 6,5%, tanto para células infectadas como para o controle (Figuras 41 e 42).

Os isolados de *L. monocytogenes* avaliados não induziram a morte celular de MDBK no período de 8 horas pós-infecção ($p>0,05$) (Figuras 41 e 42), fato que, pelos resultados encontrados nos experimentos de liberação de LDH (Figura 35), pode ser correlacionado à não citotoxicidade destas bactérias.

Em 24 horas pós-infecção, as células MDBK apresentaram resultados semelhantes aos obtidos anteriormente (Figuras 43 e 44). Independentemente da cepa de *L. monocytogenes* utilizada, a porcentagem de células apoptóticas não ultrapassou 4,5%. Não houve diferença entre os valores de células apoptóticas determinados nas amostras infectadas e no controle ($p>0,05$) (Figura 43).

A figura 44 mostra que as porcentagens de células necróticas variaram de 2,5% a 5,5%, e, assim como para a apoptose, não houve diferença com o controle ($p>0,05$).

As cepas de *L. monocytogenes* não induziram a morte celular de células MDBK 24 horas pós-infecção, como já havia sido observado para o período de 8 horas. Estes resultados estão de

acordo com os obtidos para os ensaios de liberação de LDH nesta mesma linhagem celular (Figuras 35 e 36).

Figura 41. Porcentagens de células epiteliais MDBK Anexina V⁺, características do processo apoptótico, 8 horas pós-infecção com cepas de *L. monocytogenes*, determinadas por citometria de fluxo. Média de dois experimentos em duplicata. Para letras iguais não há diferença estatística entre as cepas ($p > 0,05$). 1/2B: sorotipo 1/2b (alimento); 1/2C: sorotipo 1/2c (ambiente); 4BENV: sorotipo 4b (ambiente); 4BCLIN, P14 e P14A: sorotipo 4b (sangue).

Figura 42. Porcentagens de células epiteliais MDBK PI⁺, características do processo necrótico, 8 horas pós-infecção de incubação com cepas de *L. monocytogenes*, determinadas por citometria de fluxo. Média de dois experimentos em duplicata. Para letras iguais não há diferença estatística entre as cepas ($p > 0,05$). 1/2B: sorotipo 1/2b (alimento); 1/2C: sorotipo 1/2c (ambiente); 4BENV: sorotipo 4b (ambiente); 4BCLIN, P14 e P14A: sorotipo 4b (sangue).

Figura 43. Porcentagens de células epiteliais MDBK Anexina V⁺, características do processo apoptótico, 24 horas pós-infecção com cepas de *L. monocytogenes*, determinadas por citometria de fluxo. Média de dois experimentos em duplicata. Para letras iguais não há diferença estatística entre as cepas ($p > 0,05$). 1/2B: sorotipo 1/2b (alimento); 1/2C: sorotipo 1/2c (ambiente); 4BENV: sorotipo 4b (ambiente); 4BCLIN, P14 e P14A: sorotipo 4b (sangue).

Figura 44. Porcentagens de células epiteliais MDBK PI⁺, características do processo apoptótico, 24 horas pós-infecção com cepas de *L. monocytogenes*, determinadas por citometria de fluxo. Média de dois experimentos em duplicata. Para letras iguais não há diferença estatística entre as cepas ($p > 0,05$). 1/2B: sorotipo 1/2b (alimento); 1/2C: sorotipo 1/2c (ambiente); 4BENV: sorotipo 4b (ambiente); 4BCLIN, P14 e P14A: sorotipo 4b (sangue).

Com relação à indução necrótica, resultados semelhantes aos encontrados neste estudo foram obtidos por Valenti *et al.* (1999). Estes autores verificaram que, após infecção de células Caco-2 por cepas de *L. monocytogenes*, foram observados índices de 30% a 45% de células necróticas.

Tanto as células HeLa, como os hepatócitos, são importantes para a etapa de proliferação intracelular de *L. monocytogenes*; portanto, o processo necrótico, que é mais lento, garante que o microrganismo permaneça nestas células por mais tempo. O processo necrótico pode ser desencadeado pela alta população de *L. monocytogenes* e não por indução do microrganismo, mas a não indução ao processo apoptótico pode ser regulada pelas bactérias como um mecanismo de sobrevivência.

Os resultados apresentados neste estudo indicam que os isolados de *L. monocytogenes* não induziram ao processo apoptótico em linhagem celular HeLa e MDBK, independentemente da origem ou sorotipo dos mesmos.

Estudos realizados com macrófagos e timócitos murinos também demonstram que cepas de *L. monocytogenes* não induzem a morte por apoptose nestas linhagens celulares (BARSIG; KAUFMANN, 1997; DREVETS, 1999; DREVETS, 2001; PUERTOLLANO *et al.*, 2004).

Rogers *et al.* (1996), no entanto, demonstraram que cepas de *L. monocytogenes* foram capazes de induzir apoptose em hepatócitos murinos com fragmentação nuclear típica visualizada rapidamente em 4 e 8 horas pós-infecção. Resultados semelhantes foram obtidos por Miura *et al.* (2000), que postularam que a apoptose impediria a reinfecção das células vizinhas por *L. monocytogenes*, mas simultaneamente permitiria seu acesso a células fagocíticas, a partir das quais o patógeno poderia dispersar-se por outros órgãos.

Santos *et al.* (2005) infectaram hepatócitos murinos primários com cepas não hemolíticas de *L. monocytogenes* e verificaram que estas foram responsáveis pelo processo apoptótico das células. Esta resposta variou de acordo com a MOI e o tempo de incubação utilizados.

Teria sido importante a utilização de outras metodologias que avaliassem diferentes alterações celulares, para que se pudesse concluir sobre a atividade apoptogênica de *L. monocytogenes* para estas células.

Ainda é preciso esclarecer se a apoptose é um mecanismo especificamente induzido pela bactéria, permitindo sua rápida disseminação, ou se este representa um mecanismo de defesa do hospedeiro para limitar a infecção por *L. monocytogenes*, em alguns tipos celulares.

4.7. Polimerização do filamento de actina de cepas de *L. monocytogenes* em células eucarióticas

Frente aos resultados obtidos com os ensaios de formação de placas de lise decidiu-se verificar a formação dos filamentos de actina essencial na disseminação das cepas de *L. monocytogenes*. Ao atingir o citoplasma, *L. monocytogenes* inicia o processo de recrutamento da proteína actina presente no citoesqueleto do hospedeiro com auxílio de actA. Esta proteína encontra-se associada ao microrganismo e organiza-se em um dos pólos bacterianos, criando assim um filamento de actina que impulsiona a bactéria à superfície da membrana celular eucariótica para que se inicie o processo de disseminação.

Os experimentos realizados permitiram a visualização e enumeração das bactérias presentes dentro do citoplasma das células eucarióticas, sendo possível verificar a presença da proteína actina, em duas formas: envolvendo toda a bactéria, como uma nuvem, ou a proteína

polimerizada em um dos pólos da bactéria. Os resultados aqui apresentados são em relação à porcentagem de bactérias com filamentos de actina em um dos pólos e não somente a presença da proteína. Isto porque somente quando a actina é direcionada para um dos pólos é que ocorre a passagem célula a célula (KUHN *et al.*, 1990).

Os resultados obtidos nos ensaios de proliferação demonstraram elevadas populações bacterianas no citoplasma celular (Figura 9) quando a MOI de 50:1 foi utilizada. Entretanto, empregando-se esta MOI não foi possível visualizar as bactérias e, conseqüentemente, os filamentos de actina nas lamínulas. Desta forma, foi necessário aumentar a MOI para 100:1 para todas as cepas de *L. monocytogenes* avaliadas. Mesmo com esta alteração não se obteve resultados satisfatórios para as cepas ambientais, 1/2C e 4BENV, nos tempos de 0 e 1 hora pós-infecção, já que estas apresentam baixa capacidade de invasão (Figura 6).

A utilização de tempos de incubação superiores a 3 horas não se mostrou viável, pois, nestes tempos, ocorria saturação do citoplasma da célula eucariótica, por exemplo pela cepa P14A, o que dificultava a contagem e leitura das lâminas.

Desta maneira, os resultados aqui apresentados referem-se aos tempos de 2 e 3 horas pós-infecção, quando todas as cepas puderam ser analisadas sob microscopia (Figuras 45 e 46).

Na Figura 45 observa-se que as cepas 1/2B, 4BENV e 4BCLIN tiveram um pouco mais de 20% das bactérias com filamentos de actina. Os resultados obtidos ainda mostram que após 2 horas de proliferação intracelular cerca de 40% das bactérias de P14 possuíam filamentos de actina formados, já a cepa P14A apresentou uma porcentagem inferior (30%). O isolado 1/2C apresentou somente 10% de bactérias com filamentos de actina após 2 horas de incubação.

Apesar destes resultados distintos, as cepas não apresentaram diferenças entre si no que se refere à porcentagem de bactérias com filamentos de actina ($p>0,05$) (Figura 45).

Após 3 horas de incubação o número de bactérias do sorotipo 1/2c com filamentos de actina dobrou, sendo que este aumento relativo foi superior às demais, mas ainda com porcentagem inferior (Figura 45). Vale ressaltar que não houve, no entanto, diferença estatística entre o comportamento dos isolados e entre os tempos estudados neste ensaio ($p>0,05$).

Figura 45. Porcentagens de *L. monocytogenes* com filamentos de actina em relação ao número total de bactérias encontradas no citoplasma 2 e 3 horas pós-infecção em células HeLa. Média de dois experimentos em duplicata. Para letras iguais não há diferença estatística entre as cepas ($p>0,05$). 1/2B: sorotipo 1/2b (alimento); 1/2C: sorotipo 1/2c (ambiente); 4BENV: sorotipo 4b (ambiente); 4BCLIN, P14 e P14A: sorotipo 4b (sangue).

1/2C

4BCLIN

P14A

Figura 46. Visualização das cepas de *L. monocytogenes* 1/2C, 4BCLIN e P14A (verde) e filamentos de actina (vermelho) em células eucarióticas HeLa 3 horas pós-infecção. Resultado representativo. 1/2B: sorotipo 1/2b (alimento); 1/2C: sorotipo 1/2c (ambiente); 4BENV: sorotipo 4b (ambiente); 4BCLIN, P14 e P14A: sorotipo 4b (sangue).

Apesar dos isolados ambientais 1/2C e 4BENV apresentarem alto IGC (Figura 9) e elevada disseminação (Figura 32) em células HeLa, em relação à polimerização dos filamentos de actina, não se observou diferenças entre as cepas de *L. monocytogenes* estudadas. Estes resultados mostram que estas características, apresentadas pelas cepas ambientais, não estão relacionadas à proteína actina A. No entanto, convém ressaltar que os experimentos foram realizados nos tempos de 2 a 3 horas pós-infecção e que, em tempos mais longos, este quadro poderia se alterar.

Não foram encontrados na literatura estudos empregando células HeLa para a avaliação de produção e polimerização de filamentos de actina. Assim, a comparação dos resultados com outros trabalhos deve ser realizada com cautela, pois além das diferenças intrínsecas das cepas, o modelo celular também pode influenciar nos dados obtidos.

Empregando-se células Caco-2 como modelo celular, resultados diferentes aos apresentados no presente estudo foram encontrados. Karunasagar *et al.* (1993) verificaram que a cepa de *L. monocytogenes* EGD apresentou 79% das bactérias com filamentos de actina após 2 horas de incubação, sendo que após 3 e 4 horas este valor foi 100%. Sokolovic *et al.* (1996) observaram que cepas de *L. monocytogenes* pertencentes ao sorotipo 4b isoladas de surtos de listeriose, após 4 horas de incubação, apresentavam 100% das bactérias com filamentos de actina, assemelhando-se à cepa referência EGD.

Mueller e Freitag (2005) avaliaram a capacidade de polimerização e formação dos filamentos de actina por cepas mutantes Δhly de *L. monocytogenes* em células epiteliais Henle e Ptk2. Estes autores puderam verificar que, dependendo do modelo celular empregado, o comportamento do microrganismo variou. Enquanto em células Ptk2 essas cepas mutantes não foram capazes de escapar do fagossomo e atingir o citoplasma para iniciar o processo de recrutamento da proteína

actina, em células Henle, após 7 horas de infecção, pode-se observar que as cepas apresentaram 50% de filamentos de actina.

Todas as cepas empregadas neste estudo mostraram-se igualmente eficazes em relação à polimerização dos filamentos de actina ($p > 0,05$).

Como foi encontrada diferença nos tamanhos de placas de lise formadas em fibroblastos L929, mas não em células HeLa, pelas cepas de *L. monocytogenes* estudadas (Figuras 28 e 32), cabe ressaltar, mais uma vez, a importância de se empregar o mesmo modelo celular para se avaliar diferentes características relacionadas à virulência.

4.8. Transcrição gênica de *plcA*, *plcB* e *actA* de cepas de *L. monocytogenes* em células eucarióticas

Na tentativa de determinar a heterogeneidade na virulência de cepas de *L. monocytogenes*, alguns estudos têm sido feitos para avaliar a detecção dos genes e suas respectivas proteínas associadas ao ciclo de infecção do microrganismo. No entanto, muitas vezes, a presença destes genes não significa a transcrição dos mesmos, podendo ser detectados em cepas virulentas e avirulentas.

Os genes de virulência escolhidos para a avaliação da transcrição gênica neste estudo foram aqueles intimamente relacionados à disseminação da bactéria, incluindo a etapa de escape do fagossomo (*plcA* e *plcB*) e formação dos filamentos de actina (*actA*). É importante enfatizar que as fosfolipases estão indiretamente relacionadas à capacidade de disseminação de *L. monocytogenes*, já que *actA* só se expressa quando a bactéria encontra-se no espaço citoplasmático.

Observa-se, na figura 47, que o número de transcritos de *actA*, *plcA* e *plcB*, para as cepas de origem alimentar (1/2B) e ambiental (1/2C e 4BENV), foi mais elevado, com exceção da cepa 1/2C, para o gene *plcA*, quando comparado aos resultados obtidos para as cepas de origem clínica ($p < 0,05$).

A transcrição de *actA* foi semelhante entre as cepas de 1/2B, 1/2C e 4BENV ($p > 0,05$) e também entre o grupo das cepas clínicas (P14, P14A e 4BCLIN) ($p > 0,05$). Pode-se dizer que a expressão gênica de *actA* manteve um padrão característico correlacionado com a origem dos isolados (Figura 47).

Estes resultados diferem dos obtidos nos ensaios de polimerização dos filamentos de actina nos quais não houve diferença entre as cepas de *L. monocytogenes* de variadas origens (Figura 45). No entanto, estes dados podem estar correlacionados aos diferentes tempos analisados em ambos os ensaios.

O gene *plcA* apresentou elevado número de transcritos para a cepa de origem alimentar 1/2B e para a cepa de origem ambiental 4BENV ($p > 0,05$). Já a cepa 1/2C, também de origem ambiental, apresentou baixo número de transcritos para este mesmo gene, quando comparada às demais cepas não clínicas avaliadas ($p < 0,05$), porém superiores às cepas de origem clínica 4BCLIN, P14 e P14A ($p < 0,05$). As cepas de origem clínica apresentaram o mesmo número de transcritos de *plcA* entre si ($p > 0,05$) (Figura 47).

A transcrição gênica de *plcB* foi semelhante entre as cepas não clínicas (1/2B, 1/2C e 4BENV), assim como observado para o gene *actA* ($p > 0,05$). O mesmo ocorreu para as cepas de origem clínica quando comparadas entre si ($p > 0,05$). Como já observado para os demais genes de

virulência avaliados (*actA* e *plcA*), o número de transcritos de *plcB* foi superior para o grupo das cepas não clínicas ($p < 0,05$) (Figura 47).

Figura 47. Transcrição gênica dos genes *actA*, *plcA* e *plcB* normalizada pelo gene *housekeeping ldh* 5 horas pós-infecção de células epiteliais HeLa por cepas de *L. monocytogenes*. Média de três experimentos realizados em duplicata. Para letras iguais não há diferença estatística entre as cepas ($p > 0,05$). 1/2B: sorotipo 1/2b (alimento); 1/2C: sorotipo 1/2c (ambiente); 4BENV: sorotipo 4b (ambiente); 4BCLIN, P14 e P14A: sorotipo 4b (sangue).

Resultados semelhantes aos deste estudo foram verificados por Werbroutck *et al.* (2006). Esses autores avaliaram a transcrição gênica de *inlA* e *inlB*, de cepas de *L. monocytogenes* de origem clínica e não clínica, em meio de cultura. Verificou-se que as cepas de origem ambiental e alimentar apresentaram número de transcritos, tanto de *inlA* como de *inlB*, superior às cepas isoladas de casos de listeriose.

Apesar da alta citotoxicidade encontrada para as cepas de origem clínica 4BCLIN e P14A em células HeLa (Figuras 34 e 40), não foi possível estabelecer uma correlação com número de

transcritos dos genes de virulência estudados, o que pode indicar que este efeito citotóxico esteja relacionado à população intracelular bacteriana nas células.

Já para as cepas de origem ambiental 1/2C e 4BENV, que se mostraram altamente proliferativas e disseminativas (Figuras 17 e 32), a transcrição gênica de *plcA* e *plcB* foi superior à das cepas clínicas. Estas características, descritas anteriormente, podem, portanto, estar relacionadas a um rápido escape do compartimento fagossomal.

A cepa de origem alimentar 1/2B, apesar de apresentar elevado número de transcritos de todos os genes avaliados, não mostrou comportamento semelhante às cepas de origem ambiental. Esta cepa, no entanto, apresentou capacidade de invasão e IGC semelhante às cepas clínicas 4BCLIN e P14.

Fica difícil estabelecer uma correlação direta entre a quantificação de mRNA dos genes de virulência estudados e as características patogênicas (proliferação, disseminação, citotoxicidade) entre as cepas. Provavelmente exista um mecanismo de controle pós-transcricional atuando durante o processo infeccioso, que regule a síntese ou não de proteínas.

A tabela 3 sumariza alguns dos resultados encontrados para os ensaios realizados em meio de cultura e com células eucarióticas.

Foi observado que a cepa de origem alimentar 1/2B apresentou comportamento semelhante às cepas de origem clínica em relação à sua capacidade de invasão, proliferação intracelular e disseminação em células HeLa. As cepas de origem ambiental 1/2C e 4BENV, apesar do baixo poder de invasão em todos os modelos celulares empregados, apresentaram maior coeficiente de proliferação (IGC) e a disseminação intercelular foi semelhante às cepas de origem clínica.

Tabela 3 - Sumário dos principais resultados obtidos nos ensaios realizados com cepas de *L. monocytogenes*.

ENSAIOS	Meio de cultura			Células eucarióticas									
	CEPAS	Hly	PlcB	Invasão	UFC/mL [♦]	IGC [♦]	Placas de lise	LDH [♦]	Apoptose [♦]	Necrose [♦]	Actina	<i>actA</i>	<i>plcA</i>
1/2B	-	-	2 ^a /3 ^a /3 ^a	2 ^a /2 ^a	2 ^a /2 ^a	1 ^a /1 ^a /2 ^a	-/-	-/-	-/-	+	1 ^a	1 ^a	1 ^a
1/2C	+	+	3 ^a /3 ^a /3 ^a	2 ^a /2 ^a	1 ^a /1 ^a	1 ^a /1 ^a /1 ^a	-/-	-/-	-/-	+	1 ^a	2 ^a	1 ^a
4BENV	-	-	3 ^a /3 ^a /3 ^a	2 ^a /2 ^a	1 ^a /2 ^a	1 ^a /1 ^a /1 ^a	-/-	-/-	-/-	+	1 ^a	1 ^a	1 ^a
4BCLIN	-	-	2 ^a /2 ^a /2 ^a	1 ^a /1 ^a	2 ^a /2 ^a	1 ^a /1 ^a /2 ^a	+/-	-/-	+/-	+	2 ^a	3 ^a	2 ^a
P14	+/-	-	2 ^a /2 ^a /2 ^a	2 ^a /1 ^a	2 ^a /2 ^a	1 ^a /1 ^a /1 ^a	-/-	-/-	-/-	+	2 ^a	3 ^a	2 ^a
P14A	+	+	1 ^a /1 ^a /1 ^a	1 ^a /1 ^a	2 ^a /2 ^a	1 ^a /1 ^a /1 ^a	+/-	-/-	+/-	+	2 ^a	3 ^a	2 ^a

● células HeLa; ● células MDBK; ● fibroblastos L929

♦ para os ensaios de UFC/mL, IGC, LDH, apoptose e necrose os resultados são representativos de tempo de 24 horas pós-infecção.

A cepa de origem clínica P14 apresentou comportamento distinto com relação a algumas características relacionadas à virulência: proliferação intracelular e citotoxicidade, quando comparada às demais cepas de origem clínica. Somente as cepas clínicas 4BCLIN e P14A foram citotóxicas às células eucarióticas (HeLa), o que apresentou uma correlação com a população intracelular bacteriana.

Neste estudo, as células HeLa demonstram ser um bom modelo celular para o estudo da virulência de cepas de *L. monocytogenes*. Já o emprego de testes fenotípicos em meio de cultura deve ser avaliado com cautela, uma vez que cepas que apresentavam fraca atividade hemolítica e fosfolipídica demonstraram potencial patogênico.

A mutação em *prfA*, presente na cepa P14A, que leva à constante expressão dos fatores de virulência, aparentemente não é uma vantagem quando o microrganismo encontra-se no citoplasma da célula eucariótica.

Frente aos resultados obtidos a análise da transcrição gênica das proteínas internalina e hemolisina se faz necessária. Outro ponto importante a ser pesquisado, num futuro próximo, seria a identificação da mutação existente na cepa de origem ambiental 1/2C que lhe conferiu atividade hemolítica e fosfolipídica semelhante à P14A.

Os dados do presente estudo abrem perspectivas para a investigação do efeito do estresse (temperatura, osmolaridade) sobre cepas de *L. monocytogenes* presentes em alimentos e ambiente de processamento, com posterior análise de sua virulência, simulando assim as condições reais.

CONCLUSÕES

5. Conclusões

Frente aos dados obtidos, as cepas de *L. monocytogenes* recentemente isoladas de alimento e de ambiente de processamento de alimentos, independente do sorotipo, apresentaram potencial patogênico semelhante às cepas de origem clínica. Com base nesta constatação pode-se concluir que as cepas de *L. monocytogenes* estudadas, se forem veiculadas por alimento a indivíduos susceptíveis, representam um risco à saúde pública.

Frente aos ensaios realizados fica evidente a importância de se avaliar as etapas do ciclo de infecção para se caracterizar a virulência de cepas de *L. monocytogenes*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

ACHIEVING continuous improvement in reductions in foodborne listeriosis--a risk-based approach. **Journal of Food Protection**, v.68, n.9, p.1932-1994, 2005.

ALTEKRUSE, S.F.; COHEN, M.L.; SWERDLOW, D.L. Emerging foodborne diseases. **Emerging Infectious Diseases**, v.3, n.3, p.285-293, 1997.

ALVAREZ-DOMINGUEZ, C.; VAZQUEZ-BOLAND, J.A.; CARRASCO-MARIN, E.; LOPEZ-MATO, P.; LEYVA-COBIAN, F. Host cell heparan sulfate proteoglycans mediate attachment and entry of *Listeria monocytogenes*, and the *Listeria* I surface protein ActA is involved in heparan sulfate receptor recognition. **Infection and Immunity**, v.65, n.1, p.78-88, 1997.

AMSON, G.V.; HARACEMIV, S.M.C.; MASSON, M.L. Levantamento de dados epidemiológicos relativos à ocorrências/surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTAs) no Estado do Paraná - Brasil, no período de 1978 a 2000. **Ciência e Agrotecnologia**, v.30, n.6, p.1139-1145, 2006.

AUBRY, J.P.; BLAECKE, A.; LECOANET-HENCHOZ, S.; JEANNIN, P.; HERBAULT, N.; CARON, G.; MOINE, V.; BONNEFOY, J.Y. Annexin V used for measuring apoptosis in the early events of cellular cytotoxicity. **Cytometry**, v.37, n.3, p.197-204, 1999.

AUTIO, T.; HIELM, S.; MIETTINEN, M.; SJOBERG, A.M.; AARNISALO, K.; BJORKROTH, J.; MATTILA-SANDHOLM, T.; KORKEALA, H. Sources of *Listeria monocytogenes* contamination in a cold-smoked rainbow trout processing plant detected by pulsed-field gel electrophoresis typing. **Applied and Environmental Microbiology**, v.65, n.1, p.150-155, 1999.

AVERY, S.M.; BUNCIC, S. Differences in pathogenicity for chick embryos and growth kinetics at 37 degrees C between clinical and meat isolates of *Listeria monocytogenes* previously stored at 4 degrees C. **International Journal of Food Microbiology**, v.34, n.3, p.319-327, 1997.

BARSIG, J.; KAUFMANN, S.H. The mechanism of cell death in *Listeria monocytogenes*-infected murine macrophages is distinct from apoptosis. **Infection and Immunity**, v.65, n.10, p.4075-4081, 1997.

* De acordo com ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BEAN, N.H.; GRIFFIN, P.M.; GOULDING, J.S.; IVEY, C.B. Foodborne disease outbreaks, 5-year summary, 1983-1987. **Morbidity and Mortality Weekly Report. CDC Surveillance Summaries**, v.39, n.1, p.15-57, 1990.

BEAUREGARD, K.E.; LEE, K.D.; COLLIER, R.J.; SWANSON, J.A. pH-dependent perforation of macrophage phagosomes by listeriolysin O from *Listeria monocytogenes*. **Journal of Experimental Medicine**, v.186, n.7, p.1159-1163, 1997.

BECKERLE, M.C. Spatial control of actin filament assembly: lessons from *Listeria*. **Cell**, v.95, n.6, p.741-748, 1998.

BEHARI, J.; YOUNGMAN, P. Regulation of hly expression in *Listeria monocytogenes* by carbon sources and pH occurs through separate mechanisms mediated by PrfA. **Infection and Immunity**, v.66, n.8, p.3635-3642, 1998.

BEUCHAT, L.R.; BRACKETT, R.E. Behavior of *Listeria monocytogenes* inoculated into raw tomatoes and processed tomato products. **Applied and Environmental Microbiology**, v.57, n.5, p.1367-1371, 1991.

BHUNIA, A.K.; WESTBROOK, D.G. Alkaline phosphatase release assay to determine cytotoxicity for *Listeria* species. **Letters in Applied Microbiology**, v.26, n.4, p.305-310, 1998.

BHUNIA, A.K.; STEELE, P.J.; WESTBROOK, D.G.; BLY, L.A.; MALONEY, T.P.; JOHNSON, M.G. A six-hour *in vitro* virulence assay for *Listeria monocytogenes* using myeloma and hybridoma cells from murine and human sources. **Microbial Pathogenesis**, v.16, n.2, p.99-110, 1994.

BIERNE, H. *Listeria monocytogenes*: novel virulence factors. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON PROBLEMS OF LISTERIOSIS (ISOPOL), Savannah, 2007. Resumo. 1p.

BILLE, J.; BLANC, D.S.; SCHMID, H.; BOUBAKER, K.; BAUMGARTNER, A.; SIEGRIST, H.H.; TRITTEN, M.L.; LIENHARD, R.; BERNER, D.; ANDERAU, R.; TREBOUX, M.; DUCOMMUN, J.M.; MALINVERNI, R.; GENNE, D.; ERARD, P.H.; WAESPI, U. Outbreak of human listeriosis associated with tomme cheese in Northwest Switzerland, 2005. **Euro Surveillance**, v.11, n.6, p.91-93, 2006.

BRAUN, L.; GHEBREHIWET, B.; COSSART, P. gC1q-R/p32, a C1q-binding protein, is a receptor for the InlB invasion protein of *Listeria monocytogenes*. **EMBO Journal**, v.19, n.7, p.1458-1466, 2000.

BRAUN, L.; OHAYON, H.; COSSART, P. The InlB protein of *Listeria monocytogenes* is sufficient to promote entry into mammalian cells. **Molecular Microbiology**, v.27, n.5, p.1077-1087, 1998.

BREED, R.S.; MURRAY, E.G.D.; HITCHENS, A.P. **Bergey's manual of determinative bacteriology**. Baltimore: William and Wilkins, 1948. 1529p.

BREHM, K.; KREFT, J.; RIPIO, M.T.; VAZQUEZ-BOLAND, J.A. Regulation of virulence gene expression in pathogenic *Listeria*. **Microbiologia**, v.12, n.2, p.219-236, 1996.

BREHM, K.; RIPIO, M.T.; KREFT, J.; VAZQUEZ-BOLAND, J.A. The bvr locus of *Listeria monocytogenes* mediates virulence gene repression by beta-glucosides. **Journal of Bacteriology**, v.181, n.16, p.5024-5032, 1999.

BROSCH, R.; CATIMEL, G.; MILON, G.; BUCHRIESER, C.; VINDEL, E.; ROCOURT, J. Virulence heterogeneity of *Listeria monocytogenes* strains from various sources (food, human, animal) in immunocompetent mice and its association with typing characteristics. **Journal of Food Protection**, v.56, p.296-301, 1993.

BUBERT, A.; SOKOLOVIC, Z.; CHUN, S.K.; PAPTAEODOROU, L.; SIMM, A.; GOEBEL, W. Differential expression of *Listeria monocytogenes* virulence genes in mammalian host cells. **Molecular and General Genetics**, v.261, n.2, p.323-336, 1999.

BUCHWALOW, I.B.; EMOTO, M.; BRICH, M.; KAUFMANN, S.H. Involvement of tubulin and inhibitory G proteins in the interaction of *Listeria monocytogenes* with mouse hepatocytes. **Infection and Immunity**, v.65, n.3, p.1095-1097, 1997.

BUNCIC, S.; AVERY, S.M. Relationship between variations in pathogenicity and lag phase at 37 degrees C of *Listeria monocytogenes* previously stored at 4 degrees C. **Letters in Applied Microbiology**, v.23, n.1, p.18-22, 1996.

BUNCIC, S.; AVERY, S.M.; ROCOURT, J.; DIMITRIJEVIC, M. Can food-related environmental factors induce different behaviour in two key serovars, 4b and 1/2a, of *Listeria monocytogenes*? **International Journal of Food Microbiology**, v.65, n.3, p.201-212, 2001.

CABANES, D.; DUSSURGET, O.; DEHOUX, P.; COSSART, P. Auto, a surface associated autolysin of *Listeria monocytogenes* required for entry into eukaryotic cells and virulence. **Molecular Microbiology**, v.51, n.6, p.1601-1614, 2004.

CHAKRABORTY, T. The molecular mechanisms of actin-based intracellular motility by *Listeria monocytogenes*. **Microbiologia**, v.12, n.2, p.237-244, 1996.

CHICO-CALERO, I.; SUAREZ, M.; GONZALEZ-ZORN, B.; SCORTTI, M.; SLAGHUIS, J.; GOEBEL, W.; VAZQUEZ-BOLAND, J.A. Hpt, a bacterial homolog of the microsomal glucose-6-phosphate translocase, mediates rapid intracellular proliferation in *Listeria*. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, v.99, n.1, p.431-436, 2002.

CHIU, S.; VANDERLINDE, P.B.; DYKES, G.A. A comparison of selected methods for measuring the virulence properties of *Listeria* spp. **Canadian Journal of Microbiology**, v.52, n.4, p.301-307, 2006.

COBB, C.A.; CURTIS, G.D.; BANSI, D.S.; SLADE, E.; MEHAL, W.; MITCHELL, R.G.; CHAPMAN, R.W. Increased prevalence of *Listeria monocytogenes* in the faeces of patients receiving long-term H2-antagonists. **European Journal of Gastroenterology & Hepatology**, v.8, n.11, p.1071-1074, 1996.

COFFEY, A.; ROMBOUTS, F.M.; ABEE, T. Influence of environmental parameters on phosphatidylcholine phospholipase C production in *Listeria monocytogenes*: a convenient method to differentiate *L. monocytogenes* from other *Listeria* species. **Applied and Environmental Microbiology**, v.62, n.4, p.1252-1256, 1996.

COSSART, P. Actin-based bacterial motility. **Current Opinion in Cell Biology**, v.7, n.1, p.94-101, 1995.

COSSART, P. Met, the HGF-SF receptor: another receptor for *Listeria monocytogenes*. **Trends in Microbiology**, v.9, n.3, p.105-107, 2001.

COSSART, P.; VICENTE, M.F.; MENGAUD, J.; BAQUERO, F.; PEREZ-DIAZ, J.C.; BERCHE, P. Listeriolysin O is essential for virulence of *Listeria monocytogenes*: direct evidence obtained by gene complementation. **Infection and Immunity**, v.57, n.11, p.3629-3636, 1989.

CZUPRYNSKI, C.J.; BROWN, J.F.; ROLL, J.T. Growth at reduced temperatures increases the virulence of *Listeria monocytogenes* for intravenously but not intragastrically inoculated mice. **Microbial Pathogenesis**, v.7, n.3, p.213-223, 1989.

CZUPRYNSKI, C.J.; FAITH, N.G.; STEINBERG, H. A/J mice are susceptible and C57BL/6 mice are resistant to *Listeria monocytogenes* infection by intragastric inoculation. **Infection and Immunity**, v.71, n.2, p.682-689, 2003.

DABIRI, G.A.; SANGER, J.M.; PORTNOY, D.A.; SOUTHWICK, F.S. *Listeria monocytogenes* moves rapidly through the host-cell cytoplasm by inducing directional actin assembly. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, v.87, n.16, p.6068-6072, 1990.

DALTON, C.B.; AUSTIN, C.C.; SOBEL, J.; HAYES, P.S.; BIBB, W.F.; GRAVES, L.M.; SWAMINATHAN, B.; PROCTOR, M.E.; GRIFFIN, P.M. An outbreak of gastroenteritis and fever due to *Listeria monocytogenes* in milk. **New England Journal of Medicine**, v.336, n.2, p.100-105, 1997.

DAWSON, S.J.; EVANS, M.R.; WILLBY, D.; BARDWELL, J.; CHAMBERLAIN, N.; LEWIS, D.A. *Listeria* outbreak associated with sandwich consumption from a hospital retail shop, United Kingdom. **Euro Surveillance**, v.11, n.6, p.89-91, 2006.

DECATUR, A.L.; PORTNOY, D.A. A PEST-like sequence in listeriolysin O essential for *Listeria monocytogenes* pathogenicity. **Science**, v.290, n.5493, p.992-995, 2000.

DECKER, T.; LOHMANN-MATTHES, M.L. A quick and simple method for the quantitation of lactate dehydrogenase release in measurements of cellular cytotoxicity and tumor necrosis factor (TNF) activity. **Journal of Immunological Methods**, v.115, n.1, p.61-69, 1988.

DEL CORRAL, F.; BUCHANAN, R.L.; BENCIVENGO, M.M.; COOKE, P.H. Quantitative comparison of selected virulence associated characteristics in food and clinical isolates of *Listeria*. **Journal of Food Protection**, v.53, p.1003-1009, 1990.

DICKNEITE, C.; BOCKMANN, R.; SPORY, A.; GOEBEL, W.; SOKOLOVIC, Z. Differential interaction of the transcription factor PrfA and the PrfA-activating factor (Paf) of *Listeria monocytogenes* with target sequences. **Molecular Microbiology**, v.27, n.5, p.915-928, 1998.

DOMANN, E.; WEHLAND, J.; ROHDE, M.; PISTOR, S.; HARTL, M.; GOEBEL, W.; LEIMEISTER-WACHTER, M.; WUENSCHER, M.; CHAKRABORTY, T. A novel bacterial virulence gene in *Listeria monocytogenes* required for host cell microfilament interaction with homology to the proline-rich region of vinculin. **EMBO Journal**, v.11, n.5, p.1981-1990, 1992.

DRAMSI, S.; COSSART, P. Intracellular pathogens and the actin cytoskeleton. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v.14, p.137-166, 1998.

DRAMSI, S.; BISWAS, I.; MAGUIN, E.; BRAUN, L.; MASTROENI, P.; COSSART, P. Entry of *Listeria monocytogenes* into hepatocytes requires expression of inIB, a surface protein of the internalin multigene family. **Molecular Microbiology**, v.16, n.2, p.251-261, 1995.

DRAMSI, S.; BOURDICHON, F.; CABANES, D.; LECUIT, M.; FSIHI, H.; COSSART, P. FbpA, a novel multifunctional *Listeria monocytogenes* virulence factor. **Molecular Microbiology**, v.53, n.2, p.639-649, 2004.

DREVETS, D.A. Dissemination of *Listeria monocytogenes* by infected phagocytes. **Infection and Immunity**, v.67, n.7, p.3512-3517, 1999.

DREVETS, D.A.; JELINEK, T.A.; FREITAG, N.E. *Listeria monocytogenes*-infected phagocytes can initiate central nervous system infection in mice. **Infection and Immunity**, v.69, n.3, p.1344-1350, 2001.

DREVETS, D.A.; SAWYER, R.T.; POTTER, T.A.; CAMPBELL, P.A. *Listeria monocytogenes* infects human endothelial cells by two distinct mechanisms. **Infection and Immunity**, v.63, n.11, p.4268-4276, 1995.

ENGELBRECHT, F.; DOMINGUEZ-BERNAL, G.; HESS, J.; DICKNEITE, C.; GREIFFENBERG, L.; LAMPIDIS, R.; RAFFELSBAUER, D.; DANIELS, J.J.; KREFT, J.; KAUFMANN, S.H.; VAZQUEZ-BOLAND, J.A.; GOEBEL, W. A novel PrfA-regulated chromosomal locus, which is specific for *Listeria ivanovii*, encodes two small, secreted internalins and contributes to virulence in mice. **Molecular Microbiology**, v.30, n.2, p.405-417, 1998.

ERDENLIG, S.; AINSWORTH, A.J.; AUSTIN, F.W. Pathogenicity and production of virulence factors by *Listeria monocytogenes* isolates from channel catfish. **Journal of Food Protection**, v.63, n.5, p.613-619, 2000.

ERMOLAEVA, S.; NOVELLA, S.; VEGA, Y.; RIPIO, M.T.; SCORTTI, M.; VAZQUEZ-BOLAND, J.A. Negative control of *Listeria monocytogenes* virulence genes by a diffusible autorepressor. **Molecular Microbiology**, v.52, n.2, p.601-611, 2004.

FOOD and Agriculture Organization (FAO) expert consultation on the trade impact of *Listeria* in fish products: Amherst, Massachusetts, USA, 17-20 May 1999: proceedings. **International Journal of Food Microbiology**, v.62, n.3, p.171-274, 2000.

FARBER, J.M.; DALEY, E. Presence and growth of *Listeria monocytogenes* in naturally-contaminated meats. **International Journal of Food Microbiology**, v.22, n.1, p.33-42, 1994.

FARBER, J.M.; PETERKIN, P.I. *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. **Microbiological Reviews**, v.55, n.3, p.476-511, 1991.

FARBER, J.M.; SPEIRS, J.I. Potential use of continuous cell lines to distinguish between pathogenic and nonpathogenic *Listeria* spp. **Journal of Clinical Microbiology**, v.25, n.8, p.1463-1466, 1987.

FARBER, J.M.; DALEY, E.M.; MACKIE, M.T.; LIMERICK, B. A small outbreak of listeriosis potentially linked to the consumption of imitation crab meat. **Letters in Applied Microbiology**, v.31, n.2, p.100-104, 2000.

FARBER, J.M.; ROSS, W.H.; HARWIG, J. Health risk assessment of *Listeria monocytogenes* in Canada. **International Journal of Food Microbiology**, v.30, n.1/2, p.145-156, 1996.

FARBER, J.M.; SPEIRS, J.I.; PONTEFRAC, R.; CONNER, D.E. Characteristics of nonpathogenic strains of *Listeria monocytogenes*. **Canadian Journal of Microbiology**, v.37, n.8, p.647-650, 1991.

FARBER, J.M.; WANG, S.L.; CAI, Y.; ZHANG, S. Changes in populations of *Listeria monocytogenes* inoculated on packaged fresh-cut vegetables. **Journal of Food Protection**, v.61, n.2, p.192-195, 1998.

FINLAY, B.B.; RUSCHKOWSKI, S.; DEDHAR, S. Cytoskeletal rearrangements accompanying salmonella entry into epithelial cells. **Journal of Cell Science**, v.99, pt.2, p.283-296, 1991.

FRANCIOSA, G.; MAUGLIANI, A.; FLORIDI, F.; AURELI, P. Molecular and experimental virulence of *Listeria monocytogenes* strains isolated from cases with invasive listeriosis and febrile gastroenteritis. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v.43, n.3, p.431-439, 2005.

FRANCIS, M. S.; THOMAS, C. J. Effect of multiplicity of infection on *Listeria monocytogenes* pathogenicity for HeLa and Caco-2 cell lines. **Journal of Medical Microbiology**, v.45, n.5, p.323-330, 1996.

GAILLARD, J.L.; FINLAY, B.B. Effect of cell polarization and differentiation on entry of *Listeria monocytogenes* into the enterocyte-like Caco-2 cell line. **Infection and Immunity**, v.64, n.4, p.1299-1308, 1996.

GAILLARD, J.L.; BERCHE, P.; SANSONETTI, P. Transposon mutagenesis as a tool to study the role of hemolysin in the virulence of *Listeria monocytogenes*. **Infection and Immunity**, v.52, n.1, p.50-55, 1986.

GAILLARD, J.L.; BERCHE, P.; FREHEL, C.; GOUIN, E.; COSSART, P. Entry of *Listeria monocytogenes* into cells is mediated by internalin, a repeat protein reminiscent of surface antigens from gram-positive cocci. **Cell**, v.65, n.7, p.1127-1141, 1991.

GAILLARD, J.L.; BERCHE, P.; MOUNIER, J.; RICHARD, S.; SANSONETTI, P. *In vitro* model of penetration and intracellular growth of *Listeria monocytogenes* in the human enterocyte-like cell line Caco-2. **Infection and Immunity**, v.55, n.11, p.2822-2829, 1987.

GAILLARD, J.L.; JAUBERT, F.; BERCHE, P. The *inlAB* locus mediates the entry of *Listeria monocytogenes* into hepatocytes *in vivo*. **Journal of Experimental Medicine**, v.183, n.2, p.359-369, 1996.

GARNER, M. R.; NJAA, B. L.; WIEDMANN, M.; BOOR, K. J. Sigma B contributes to *Listeria monocytogenes* gastrointestinal infection but not to systemic spread in the guinea pig infection model. **Infection and Immunity**, v.74, n.2, p.876-886, 2006.

GATTUSO, A.; GIANFRANCESCHI, M.; SESSA, R.; TAGGI, F.; POURSHABAN, M.; AURELI, P. *In vivo* and *in vitro* assessment of the virulence of *Listeria monocytogenes* strains. **New Microbiologica**, v.23, n.3, p.289-295, 2000.

GAULIN, C.; RAMSAY, D.; RINGUETTE, L.; ISMAIL, J. First documented outbreak of *Listeria monocytogenes* in Quebec, 2002. **Canada Communicable Disease Report**, v.29, n.21, p.181-186, 2003.

GEDDE, M.M.; HIGGINS, D.E.; TILNEY, L.G.; PORTNOY, D.A. Role of listeriolysin O in cell-to-cell spread of *Listeria monocytogenes*. **Infection and Immunity**, v.68, n.2, p.999-1003, 2000.

GEOFFROY, C.; GAILLARD, J.L.; ALOUF, J.E.; BERCHE, P. Production of thiol-dependent haemolysins by *Listeria monocytogenes* and related species. **Journal of General Microbiology**, v.135, n.3, p.481-487, 1989.

GEOFFROY, C.; RAVENEAU, J.; BERETTI, J.L.; LECROISEY, A.; VAZQUEZ-BOLAND, J.A.; ALOUF, J.E.; BERCHE, P. Purification and characterization of an extracellular 29-kilodalton phospholipase C from *Listeria monocytogenes*. **Infection and Immunity**, v.59, n.7, p.2382-2388, 1991.

GIBSON, U.E.; HEID, C.A.; WILLIAMS, P.M. A novel method for real time quantitative RT-PCR. **Genome Research**, v.6, n.10, p.995-1001, 1996.

GILBRETH, S.E.; CALL, J.E.; WALLACE, F.M.; SCOTT, V.N.; CHEN, Y.; LUCHANSKY, J.B. Relatedness of *Listeria monocytogenes* Isolates recovered from selected ready-to-eat foods and listeriosis patients in the United States. **Applied and Environmental Microbiology**, v.71, n.12, p.8115-8122, 2005.

GILOT, P.; GENICOT, A.; ANDRE, P. Serotyping and esterase typing for analysis of *Listeria monocytogenes* populations recovered from foodstuffs and from human patients with listeriosis in Belgium. **Journal of Clinical Microbiology**, v.34, n.4, p.1007-1010, 1996.

GLOMSKI, I.J.; DECATUR, A.L.; PORTNOY, D.A. *Listeria monocytogenes* mutants that fail to compartmentalize listeriolysin O activity are cytotoxic, avirulent, and unable to evade host extracellular defenses. **Infection and Immunity**, v.71, n.12, p.6754-6765, 2003.

GOEBEL, W.; KREFT, J. Cytolysins and the intracellular life of bacteria. **Trends in Microbiology**, v.5, n.3, p.86-88, 1997.

GOLDFINE, H.; KNOB, C. Purification and characterization of *Listeria monocytogenes* phosphatidylinositol-specific phospholipase C. **Infection and Immunity**, v.60, n.10, p.4059-4067, 1992.

GOLDFINE, H.; JOHNSTON, N.C.; KNOB, C. Nonspecific phospholipase C of *Listeria monocytogenes*: activity on phospholipids in Triton X-100-mixed micelles and in biological membranes. **Journal of Bacteriology**, v.175, n.14, p.4298-4306, 1993.

GOULET, V.; JACQUET, C.; MARTIN, P.; VAILLANT, V.; LAURENT, E.; DE VALK, H. Surveillance of human listeriosis in France, 2001-2003. **Euro Surveillance**, v.11, n.6, p.79-81, 2006.

GRAY, K.M.; BHUNIA, A.K. Specific detection of cytopathogenic *Listeria monocytogenes* using a two-step method of immunoseparation and cytotoxicity analysis. **Journal of Microbiological Methods**, v.60, n.2, p.259-268, 2005.

GRAY, M.J.; FREITAG, N.E.; BOOR, K.J. How the bacterial pathogen *Listeria monocytogenes* mediates the switch from environmental Dr. Jekyll to pathogenic Mr. Hyde. **Infection and Immunity**, v.74, n.5, p.2505-2512, 2006.

GRAY, M.J.; ZADOKS, R.N.; FORTES, E.D.; DOGAN, B.; CAI, S.; CHEN, Y.; SCOTT, V.N.; GOMBAS, D.E.; BOOR, K.J.; WIEDMANN, M. *Listeria monocytogenes* isolates from foods and humans form distinct but overlapping populations. **Applied and Environmental Microbiology**, v.70, n.10, p.5833-5841, 2004.

GREGORY, S.H.; SAGNIMENI, A.J.; WING, E.J. Expression of the *inlAB* operon by *Listeria monocytogenes* is not required for entry into hepatic cells *in vivo*. **Infection and Immunity**, v.64, n.10, p.3983-3986, 1996.

GREIFFENBERG, L.; GOEBEL, W.; KIM, K.S.; WEIGLEIN, I.; BUBERT, A.; ENGELBRECHT, F.; STINS, M.; KUHN, M. Interaction of *Listeria monocytogenes* with human brain microvascular endothelial cells: *InlB*-dependent invasion, long-term intracellular growth, and spread from macrophages to endothelial cells. **Infection and Immunity**, v.66, n.11, p.5260-5267, 1998.

GRUNDLING, A.; GONZALEZ, M.D.; HIGGINS, D.E. Requirement of the *Listeria monocytogenes* broad-range phospholipase PC-PLC during infection of human epithelial cells. **Journal of Bacteriology**, v.185, n.21, p.6295-6307, 2003.

GUDMUNDSDOTTIR, S.; ROCHE, S.M.; KRISTINSSON, K.G.; KRISTJANSSON, M. Virulence of *Listeria monocytogenes* isolates from humans and smoked salmon, peeled shrimp, and their processing environments. **Journal of Food Protection**, v.69, n.9, p.2157-2160, 2006.

GUZMAN, C.A.; DOMANN, E.; ROHDE, M.; BRUDER, D.; DARJI, A.; WEISS, S.; WEHLAND, J.; CHAKRABORTY, T.; TIMMIS, K.N. Apoptosis of mouse dendritic cells is triggered by listeriolysin, the major virulence determinant of *Listeria monocytogenes*. **Molecular Microbiology**, v.20, n.1, p.119-126, 1996.

HAAS, A.; DUMBSKY, M.; KREFT, J. Listeriolysin genes: complete sequence of *ilo* from *Listeria ivanovii* and of *lso* from *Listeria seeligeri*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1130, n.1, p.81-84, 1992.

HANAWA, T.; YAMAMOTO, T.; KAMIYA, S. *Listeria monocytogenes* can grow in macrophages without the aid of proteins induced by environmental stresses. **Infection and Immunity**, v.63, n.12, p.4595-4599, 1995.

HASAN, Z.; ASHRAF, M.; TAYYEBI, A.; HUSSAIN, R.M. Iprae inhibits apoptosis in THP-1 cells by downregulation of Bad and Bak and upregulation of Mcl-1 gene expression. **BMC Microbiology**, v.6, p.78, 2006.

HASLINGER-LOFFLER, B.; KAHL, B.C.; GRUNDMEIER, M.; STRANGFELD, K.; WAGNER, B.; FISCHER, U.; CHEUNG, A.L.; PETERS, G.; SCHULZE-OSTHOFF, K.; SINHA, B. Multiple virulence factors are required for *Staphylococcus aureus*-induced apoptosis in endothelial cells. **Cellular Microbiology**, v.7, n.8, p.1087-1097, 2005.

HEDBERG, C. *Listeria* in Europe: the need for a European surveillance network is growing. **Euro Surveillance**, v.11, n.6, p.75-76, 2006.

HEID, C.A.; STEVENS, J.; LIVAK, K.J.; WILLIAMS, P.M. Real time quantitative PCR. **Genome Research**, v.6, n.10, p.986-994, 1996.

HESS, J.; GENTSCHEV, I.; SZALAY, G.; LADEL, C.; BUBERT, A.; GOEBEL, W.; KAUFMANN, S.H. *Listeria monocytogenes* p60 supports host cell invasion by and *in vivo* survival of attenuated *Salmonella typhimurium*. **Infection and Immunity**, v.63, n.5, p.2047-2053, 1995.

HOFER, E.; NASCIMENTO, R.S.; DE OLIVEIRA, M.A. *Listeria monocytogenes* meningitis: case reports in patients from the Federal District. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.31, n.2, p.173-177, 1998.

HOFER, E.; REIS, C.M.; HOFER, C.B. Serovars of *Listeria monocytogenes* and related species isolated from human clinical specimens. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.39, n.1, p.32-37, 2006.

IRETON, K.; COSSART, P. Interaction of invasive bacteria with host signaling pathways. **Current Opinion in Cell Biology**, v.10, n.2, p.276-283, 1998.

IRETON, K.; PAYRASTRE, B.; CHAP, H.; OGAWA, W.; SAKAUE, H.; KASUGA, M.; COSSART, P. A role for phosphoinositide 3-kinase in bacterial invasion. **Science**, v.274, n.5288, p.780-782, 1996.

ISBERG, R.R.; TRAN VAN NHIEU, G. Binding and internalization of microorganisms by integrin receptors. **Trends in Microbiology**, v.2, n.1, p.10-14, 1994.

JACQUET, C.; DOUMITH, M.; GORDON, J.I.; MARTIN, P.M.; COSSART, P.; LECUIT, M. A molecular marker for evaluating the pathogenic potential of foodborne *Listeria monocytogenes*. **Journal of Infectious Diseases**, v.189, n.11, p.2094-2100, 2004.

JACQUET, C.; GOUIN, E.; JEANNEL, D.; COSSART, P.; ROCOURT, J. Expression of ActA, Ami, InlB, and listeriolysin O in *Listeria monocytogenes* of human and food origin. **Applied and Environmental Microbiology**, v.68, n.2, p.616-622, 2002.

JARADAT, Z.W.; BHUNIA, A.K. Adhesion, invasion, and translocation characteristics of *Listeria monocytogenes* serotypes in Caco-2 cell and mouse models. **Applied and Environmental Microbiology**, v.69, n.6, p.3640-3645, 2003.

JONES, N.L.; ISLUR, A.; HAQ, R.; MASCARENHAS, M.; KARMALI, M.A.; PERDUE, M.H.; ZANKE, B.W.; SHERMAN, P.M. *Escherichia coli* Shiga toxins induce apoptosis in epithelial cells that is regulated by the Bcl-2 family. **American Journal of Physiology**, v.278, n.5, pt.1, p.G811-G819, 2000.

JONQUIERES, R.; BIERNE, H.; MENGAUD, J.; COSSART, P. The inlA gene of *Listeria monocytogenes* LO28 harbors a nonsense mutation resulting in release of internalin. **Infection and Immunity**, v.66, n.7, p.3420-3422, 1998.

KARUNASAGAR, I.; KROHNE, G.; GOEBEL, W. *Listeria ivanovii* is capable of cell-to-cell spread involving actin polymerization. **Infection and Immunity**, v.61, n.1, p.162-169, 1993.

KARUNASAGAR, I.; SENGHAAS, B.; KROHNE, G.; GOEBEL, W. Ultrastructural study of *Listeria monocytogenes* entry into cultured human colonic epithelial cells. **Infection and Immunity**, v.62, n.8, p.3554-3558, 1994.

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

KATHARIOU, S. Serotype 4b-specific antigens of *Listeria monocytogenes*. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON PROBLEMS OF LISTERIOSIS (ISOPOL), Savannah, 2007. Resumo. 1p.

KATHARIOU, S.; METZ, P.; HOF, H.; GOEBEL, W. Tn916-induced mutations in the hemolysin determinant affecting virulence of *Listeria monocytogenes*. **Journal of Bacteriology**, v.169, n.3, p.1291-1297, 1987.

KATHARIOU, S.; PINE, L.; GEORGE, V.; CARLONE, G.M.; HOLLOWAY, B.P. Nonhemolytic *Listeria monocytogenes* mutants that are also noninvasive for mammalian cells in culture: evidence for coordinate regulation of virulence. **Infection and Immunity**, v.58, n.12, p.3988-3995, 1990.

KATHARIOU, S.; ROCOURT, J.; HOF, H.; GOEBEL, W. Levels of *Listeria monocytogenes* hemolysin are not directly proportional to virulence in experimental infections of mice. **Infection and Immunity**, v.56, n.2, p.534-536, 1988.

KIM, S.H.; BAKKO, M.K.; KNOWLES, D.; BORUCKI, M.K. Oral inoculation of A/J mice for detection of invasiveness differences between *Listeria monocytogenes* epidemic and environmental strains. **Infection and Immunity**, v.72, n.7, p.4318-4321, 2004.

KOCKS, C.; GOUIN, E.; TABOURET, M.; BERCHE, P.; OHAYON, H.; COSSART, P. *L. monocytogenes*-induced actin assembly requires the actA gene product, a surface protein. **Cell**, v.68, n.3, p.521-531, 1992.

KORNACKI, J.L. Controlling *Listeria* in the food processing environment. **Food Technology**, v.59, n.11, p.6, 2005.

KREFT, J.; VAZQUEZ-BOLAND, J.A. Regulation of virulence genes in *Listeria*. **International Journal of Medical Microbiology**, v.291, n.2, p.145-157, 2001.

KREFT, J.; DUMBSKY, M.; THEISS, S. The actin-polymerization protein from *Listeria ivanovii* is a large repeat protein which shows only limited amino acid sequence homology to ActA from *Listeria monocytogenes*. **FEMS Microbiology Letters**, v.126, n.2, p.113-121, 1995.

KREFT, J.; FUNKE, D.; SCHLESINGER, R.; LOTTSPEICH, F.; GOEBEL, W. Purification and characterization of cytolysins from *Listeria monocytogenes* serovar 4b and *Listeria ivanovii*. **Acta Microbiologica Hungarica**, v.36, n.2/3, p.189-192, 1989.

KUHN, M.; GOEBEL, W. Molecular studies on the virulence of *Listeria monocytogenes*. **Genetic Engineering**, v.17, p.31-51, 1995.

KUHN, M.; PREVOST, M.C.; MOUNIER, J.; SANSONETTI, P.J. A nonvirulent mutant of *Listeria monocytogenes* does not move intracellularly but still induces polymerization of actin. **Infection and Immunity**, v.58, n.11, p.3477-3486, 1990.

LAMMERDING, A.M.; GLASS, K.A.; GENDRON-FITZPATRICK, A.; DOYLE, M.P. Determination of virulence of different strains of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* by oral inoculation of pregnant mice. **Applied and Environmental Microbiology**, v.58, n.12, p.3991-4000, 1992.

LAMPIDIS, R.; GROSS, R.; SOKOLOVIC, Z.; GOEBEL, W.; KREFT, J. The virulence regulator protein of *Listeria ivanovii* is highly homologous to PrfA from *Listeria monocytogenes* and both belong to the Crp-Fnr family of transcription regulators. **Molecular Microbiology**, v.13, n.1, p.141-151, 1994.

LANDGRAF, I.M.; KOBATA, A.M.M.; JAKABI, M.; KIRSCHBAUM, C.R.A.; MARCHI, C.R. Surto de meningite por *Listeria monocytogenes*. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v.58, n.1, p.63-67, 1999.

LARSEN, C.N.; NORRUNG, B.; SOMMER, H.M.; JAKOBSEN, M. *In vitro* and *in vivo* invasiveness of different pulsed-field gel electrophoresis types of *Listeria monocytogenes*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.68, n.11, p.5698-5703, 2002.

LASA, I.; DEHOUX, P.; COSSART, P. Actin polymerization and bacterial movement. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1402, n.3, p.217-228, 1998.

LECUIT, M.; COSSART, P. Genetically-modified-animal models for human infections: the *Listeria* paradigm. **Trends in Molecular Medicine**, v.8, n.11, p.537-542, 2002.

LECUIT, M.; DRAMSI, S.; GOTTARDI, C.; FEDOR-CHAIKEN, M.; GUMBINER, B.; COSSART, P. A single amino acid in E-cadherin responsible for host specificity towards the human pathogen *Listeria monocytogenes*. **EMBO Journal**, v.18, n.14, p.3956-3963, 1999.

LECUIT, M.; VANDORMAEL-POURNIN, S.; LEFORT, J.; HUERRE, M.; GOUNON, P.; DUPUY, C.; BABINET, C.; COSSART, P. A transgenic model for listeriosis: role of internalin in crossing the intestinal barrier. **Science**, v.292, n.5522, p.1722-1725, 2001.

LETY, M.A.; FREHEL, C.; DUBAIL, I.; BERETTI, J.L.; KAYAL, S.; BERCHE, P.; CHARBIT, A. Identification of a PEST-like motif in listeriolysin O required for phagosomal escape and for virulence in *Listeria monocytogenes*. **Molecular Microbiology**, v.39, n.5, p.1124-1139, 2001.

LIBERTI, R.; FRANCIOSA, G.; GIANFRANCESCHI, M.; AURELI, P. Effect of combined lysozyme and lipase treatment on the survival of *Listeria monocytogenes*. **International Journal of Food Microbiology**, v.32, n.1/2, p.235-242, 1996.

LINGNAU, A.; DOMANN, E.; HUDEL, M.; BOCK, M.; NICHTERLEIN, T.; WEHLAND, J.; CHAKRABORTY, T. Expression of the *Listeria monocytogenes* EGD inlA and inlB genes, whose products mediate bacterial entry into tissue culture cell lines, by PrfA-dependent and -independent mechanisms. **Infection and Immunity**, v.63, n.10, p.3896-3903, 1995.

LIU, D. *Listeria monocytogenes*: comparative interpretation of mouse virulence assay. **FEMS Microbiology Letters**, v.233, n.1, p.159-164, 2004.

LIVAK, K.J.; FLOOD, S.J.; MARMARO, J.; GIUSTI, W.; DEETZ, K. Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. **PCR Methods and Applications**, v.4, n.6, p.357-362, 1995.

LYYTIKAINEN, O.; NAKARI, U.M.; LUKINMAA, S.; KELA, E.; NGUYEN TRAN MINH, N.; SIITONEN, A. Surveillance of listeriosis in Finland during 1995-2004. **Euro Surveillance**, v.11, n.6, p.82-85, 2006.

MACHESKY, L.M.; GOULD, K.L. The Arp2/3 complex: a multifunctional actin organizer. **Current Opinion in Cell Biology**, v.11, n.1, p.117-121, 1999.

MARCO, A.J.; ALTIMIRA, J.; PRATS, N.; LOPEZ, S.; DOMINGUEZ, L.; DOMINGO, M.; BRIONES, V. Penetration of *Listeria monocytogenes* in mice infected by the oral route. **Microbial Pathogenesis**, v.23, n.5, p.255-263, 1997.

MARCO, A.J.; PRATS, N.; RAMOS, J.A.; BRIONES, V.; BLANCO, M.; DOMINGUEZ, L.; DOMINGO, M. A microbiological, histopathological and immunohistological study of the intragastric inoculation of *Listeria monocytogenes* in mice. **Journal of Comparative Pathology**, v.107, n.1, p.1-9, 1992.

MARQUIS, H.; DOSHI, V.; PORTNOY, D.A. The broad-range phospholipase C and a metalloprotease mediate listeriolysin O-independent escape of *Listeria monocytogenes* from a primary vacuole in human epithelial cells. **Infection and Immunity**, v.63, n.11, p.4531-4534, 1995.

MARQUIS, H.; GOLDFINE, H.; PORTNOY, D.A. Proteolytic pathways of activation and degradation of a bacterial phospholipase C during intracellular infection by *Listeria monocytogenes*. **Journal of Cell Biology**, v.137, n.6, p.1381-1392, 1997.

MCKELLAR, R.C. Novel mechanism for the CAMP reaction between *Listeria monocytogenes* and *Corynebacterium equi*. **International Journal of Food Microbiology**, v.18, n.1, p.77-82, 1993.

MCLAUCHLIN, J. Distribution of serovars of *Listeria monocytogenes* isolated from different categories of patients with listeriosis. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v.9, n.3, p.210-213, 1990.

MCLAUCHLIN, J.; GREENWOOD, M.H.; PINI, P.N. The occurrence of *Listeria monocytogenes* in cheese from a manufacturer associated with a case of listeriosis. **International Journal of Food Microbiology**, v.10, n.3/4, p.255-262, 1990.

MEAD, P.S.; SLUTSKER, L.; DIETZ, V.; MCCAIG, L.F.; BRESEE, J.S.; SHAPIRO, C.; GRIFFIN, P.M.; TAUXE, R.V. Food-related illness and death in the United States. **Emerging Infectious Diseases**, v.5, n.5, p.607-625, 1999.

MENGAUD, J.; OHAYON, H.; GOUNON, P.; MEGE, R.M.; COSSART, P. E-cadherin is the receptor for internalin, a surface protein required for entry of *L. monocytogenes* into epithelial cells. **Cell**, v.84, n.6, p.923-932, 1996.

MENGAUD, J.; VICENTE, M.F.; CHENEVERT, J.; PEREIRA, J.M.; GEOFFROY, C.; GICQUEL-SANZEY, B.; BAQUERO, F.; PEREZ-DIAZ, J.C.; COSSART, P. Expression in *Escherichia coli* and sequence analysis of the listeriolysin O determinant of *Listeria monocytogenes*. **Infection and Immunity**, v.56, n.4, p.766-772, 1988.

MENON, A.; SHROYER, M.L.; WAMPLER, J.L.; CHAWAN, C.B.; BHUNIA, A.K. *In vitro* study of *Listeria monocytogenes* infection to murine primary and human transformed B cells. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v.26, n.3, p.157-174, 2003.

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. **Zentralblatt fuer Veterinaermedizin Reihe B**, v.39, n.8, p.575-584, 1992.

MIDELET, G.; KOBILINSKY, A.; CARPENTIER, B. Construction and analysis of fractional multifactorial designs to study attachment strength and transfer of *Listeria monocytogenes* from pure or mixed biofilms after contact with a solid model food. **Applied and Environmental Microbiology**, v.72, n.4, p.2313-2321, 2006.

MILOHANIC, E.; GLASER, P.; COPPEE, J.Y.; FRANGEUL, L.; VEGA, Y.; VAZQUEZ-BOLAND, J.A.; KUNST, F.; COSSART, P.; BUCHRIESER, C. Transcriptome analysis of *Listeria monocytogenes* identifies three groups of genes differently regulated by PrfA. **Molecular Microbiology**, v.47, n.6, p.1613-1625, 2003.

MINITAB 2007. Disponível em: <http://www.minitabbrasil.com.br/>. Acesso em: 30 abr. 2007.

MIURA, T.; NISHIKAWA, S.; SASAKI, S.; YAMADA, K.; HASEGAWA, S.; MIZUKI, D.; MIZUKI, M.; HATAYAMA, I.; SEKIKAWA, K.; TAGAWA, Y.; IWAKURA, Y.; NAKANE, A. Roles of endogenous cytokines in liver apoptosis of mice in lethal *Listeria monocytogenes* infection. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v.28, n.4, p.335-341, 2000.

MONZO, H. J. Intracellular induction of *Listeria monocytogenes* invasiveness and contribution of InlA and InlB to cell-to-cell spread. 2007. [comunicação pessoal].

MOUNIER, J.; RYTER, A.; COQUIS-RONDON, M.; SANSONETTI, P.J. Intracellular and cell-to-cell spread of *Listeria monocytogenes* involves interaction with F-actin in the enterocytelike cell line Caco-2. **Infection and Immunity**, v.58, n.4, p.1048-1058, 1990.

MUELLER, K.J.; FREITAG, N.E. Pleiotropic enhancement of bacterial pathogenesis resulting from the constitutive activation of the *Listeria monocytogenes* regulatory factor PrfA. **Infection and Immunity**, v.73, n.4, p.1917-1926, 2005.

MURRAY, E.G.D.; WEBB, R.A.; SWANN, M.B.R. A disease of rabbits characterized by a large mononuclear leukocytosis, caused by a hitherto undescribed bacillus *Bacterium monocytogenes* (n.sp.). **Journal of Pathology and Bacteriology**, v.29, p.407-439, 1926.

MYERS, E.R.; DALLMIER, A.W.; MARTIN, S.E. Sodium chloride, potassium chloride, and virulence in *Listeria monocytogenes*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.59, n.7, p.2082-2086, 1993.

NEUMEISTER, B.; FAIGLE, M.; LAUBER, K.; NORTHOFF, H.; WESSELBORG, S. *Legionella pneumophila* induces apoptosis via the mitochondrial death pathway. **Microbiology**, v.148, n.11, p.3639-3650, 2002.

NIEBUHR, K.C.T.; KOLLER, P.; WELHAND, J. Production of monoclonal antibodies to the phosphatidyl-choline-specific phospholipase C of *Listeria monocytogenes*, a virulence factor for this species. **Medical Microbiology Letters**, v.2, p.9-16, 1993.

NIGHTINGALE, K.K.; WINDHAM, K.; MARTIN, K.E.; YEUNG, M.; WIEDMANN, M. Select *Listeria monocytogenes* subtypes commonly found in foods carry distinct nonsense mutations in *inlA*, leading to expression of truncated and secreted internalin A, and are associated with a reduced invasion phenotype for human intestinal epithelial cells. **Applied and Environmental Microbiology**, v.71, n.12, p.8764-8772, 2005.

NORRUNG, B.; ANDERSEN, J.K. Variations in virulence between different electrophoretic types of *Listeria monocytogenes*. **Letters in Applied Microbiology**, v.30, n.3, p.228-232, 2000.

NORTON, D.M.; SCARLETT, J.M.; HORTON, K.; SUE, D.; THIMOTHE, J.; BOOR, K.J.; WIEDMANN, M. Characterization and pathogenic potential of *Listeria monocytogenes* isolates from the smoked fish industry. **Applied and Environmental Microbiology**, v.67, n.2, p.646-653, 2001.

OAKS, E.V.; WINGFIELD, M.E.; FORMAL, S.B. Plaque formation by virulent *Shigella flexneri*. **Infection and Immunity**, v.48, n.1, p.124-129, 1985.

OJENIYI, B.; WEGENER, H.C.; JENSEN, N.E.; BISGAARD, M. *Listeria monocytogenes* in poultry and poultry products: epidemiological investigations in seven Danish abattoirs. **Journal of Applied Bacteriology**, v.80, n.4, p.395-401, 1996.

OKAMOTO, M.; NAKANE, A.; MINAGAWA, T. Host resistance to an intragastric infection with *Listeria monocytogenes* in mice depends on cellular immunity and intestinal bacterial flora. **Infection and Immunity**, v.62, n.8, p.3080-3085, 1994.

OLIER, M.; PIERRE, F.; LEMAITRE, J.P.; DIVIES, C.; ROUSSET, A.; GUZZO, J. Assessment of the pathogenic potential of two *Listeria monocytogenes* human faecal carriage isolates. **Microbiology**, v.148, n.6, p.1855-1862, 2002.

OUTBREAK of listeriosis--northeastern United States, 2002. **MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report**, v.51, n.42, p.950-951, 2002.

PARIDA, S.K.; DOMANN, E.; ROHDE, M.; MULLER, S.; DARJI, A.; HAIN, T.; WEHLAND, J.; CHAKRABORTY, T. Internalin B is essential for adhesion and mediates the invasion of *Listeria monocytogenes* into human endothelial cells. **Molecular Microbiology**, v.28, n.1, p.81-93, 1998.

PINE, L.; KATHARIOU, S.; QUINN, F.; GEORGE, V.; WENGER, J.D.; WEAVER, R.E. Cytopathogenic effects in enterocytelike Caco-2 cells differentiate virulent from avirulent *Listeria* strains. **Journal of Clinical Microbiology**, v.29, n.5, p.990-996, 1991.

PIZARRO-CERDA, J.; COSSART, P. Subversion of cellular functions by *Listeria monocytogenes*. **Journal of Pathology**, v.208, n.2, p.215-223, 2006.

PORTNOY, D.A.; CHAKRABORTY, T.; GOEBEL, W.; COSSART, P. Molecular determinants of *Listeria monocytogenes* pathogenesis. **Infection and Immunity**, v.60, n.4, p.1263-1267, 1992.

PORTNOY, D.A.; JACKS, P.S.; HINRICHS, D.J. Role of hemolysin for the intracellular growth of *Listeria monocytogenes*. **Journal of Experimental Medicine**, v.167, n.4, p.1459-1471, 1988.

PROMADEJ, N.; FIEDLER, F.; COSSART, P.; DRAMSI, S.; KATHARIOU, S. Cell wall teichoic acid glycosylation in *Listeria monocytogenes* serotype 4b requires gtcA, a novel, serogroup-specific gene. **Journal of Bacteriology**, v.181, n.2, p.418-425, 1999.

PRON, B.; BOUMAILA, C.; JAUBERT, F.; SARNACKI, S.; MONNET, J.P.; BERCHE, P.; GAILLARD, J.L. Comprehensive study of the intestinal stage of listeriosis in a rat ligated ileal loop system. **Infection and Immunity**, v.66, n.2, p.747-755, 1998.

PRELIMINARY FoodNet data on the incidence of infection with pathogens transmitted commonly through food—10 States, United States, 2005. **MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report**, v.55, n.14, p.392-395, 2006.

PUERTOLLANO, M.A.; DE PABLO, M.A.; ALVAREZ DE CIENFUEGOS, G. Anti-oxidant properties of N-acetyl-L-cysteine do not improve the immune resistance of mice fed dietary lipids to *Listeria monocytogenes* infection. **Clinical Nutrition**, v.22, n.3, p.313-319, 2003.

PUERTOLLANO, M.A.; PUERTOLLANO, E.; JIMENEZ-VALERA, M.; RUIZ-BRAVO, A.; DE PABLO, M.A.; CIENFUEGOS, G.A. Lack of apoptosis in *Listeria monocytogenes*-infected thymocytes from mice fed with dietary lipids. **Current Microbiology**, v.48, n.5, p.373-378, 2004.

RAVENEAU, J.; GEOFFROY, C.; BERETTI, J.L.; GAILLARD, J.L.; ALOUF, J.E.; BERCHE, P. Reduced virulence of a *Listeria monocytogenes* phospholipase-deficient mutant obtained by transposon insertion into the zinc metalloprotease gene. **Infection and Immunity**, v.60, n.3, p.916-921, 1992.

RENZONI, A.; COSSART, P.; DRAMSI, S. PrfA, the transcriptional activator of virulence genes, is upregulated during interaction of *Listeria monocytogenes* with mammalian cells and in eukaryotic cell extracts. **Molecular Microbiology**, v.34, n.3, p.552-561, 1999.

RIPIO, M.T.; BREHM, K.; LARA, M.; SUAREZ, M.; VAZQUEZ-BOLAND, J.A. Glucose-1-phosphate utilization by *Listeria monocytogenes* is PrfA dependent and coordinately expressed with virulence factors. **Journal of Bacteriology**, v.179, n.22, p.7174-7180, 1997b.

RIPIO, M.T.; DOMINGUEZ-BERNAL, G.; LARA, M.; SUAREZ, M.; VAZQUEZ-BOLAND, J.A. A Gly145Ser substitution in the transcriptional activator PrfA causes constitutive overexpression of virulence factors in *Listeria monocytogenes*. **Journal of Bacteriology**, v.179, n.5, p.1533-1540, 1997a.

RIPIO, M.T.; DOMINGUEZ-BERNAL, G.; SUAREZ, M.; BREHM, K.; BERCHE, P.; VAZQUEZ-BOLAND, J.A. Transcriptional activation of virulence genes in wild-type strains of *Listeria monocytogenes* in response to a change in the extracellular medium composition. **Research in Microbiology**, v.147, n.5, p.371-384, 1996.

ROBBINS, J.R.; BARTH, A.I.; MARQUIS, H.; DE HOSTOS, E.L.; NELSON, W.J.; THERIOT, J.A. *Listeria monocytogenes* exploits normal host cell processes to spread from cell to cell. **Journal of Cell Biology**, v.146, n.6, p.1333-1350, 1999.

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

ROBERTS, A.; CHAN, Y.; WIEDMANN, M. Definition of genetically distinct attenuation mechanisms in naturally virulence-attenuated *Listeria monocytogenes* by comparative cell culture and molecular characterization. **Applied and Environmental Microbiology**, v.71, n.7, p.3900-3910, 2005.

ROCHE, S.M.; GRACIEUX, P.; MILOHANIC, E.; ALBERT, I.; VIRLOGEUX-PAYANT, I.; TEMOIN, S.; GREPINET, O.; KEROUANTON, A.; JACQUET, C.; COSSART, P.; VELGE, P. Investigation of specific substitutions in virulence genes characterizing phenotypic groups of low-virulence field strains of *Listeria monocytogenes*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.71, n.10, p.6039-6048, 2005.

ROCHE, S.M.; 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. **International Journal of Food Microbiology**, v.68, n.1/2, p.33-44, 2001.

ROCOURT, J.; BILLE, J. Foodborne listeriosis. **World Health Statistics Quarterly**, v.50, n.1/2, p.67-73, 1997.

ROCOURT, J.; ESPAZE, E.P.; MINCK, R.; CATIMEL, B.; HUBERT, B.; COURTIEU, A.L. Cluster of listeriosis isolates with different serovar and phagovar characteristics. **Lancet**, v.2, n.8673, p.1217-1218, 1989.

ROCOURT, J.; JACQUET, C.; REILLY, A. Epidemiology of human listeriosis and seafoods. **International Journal of Food Microbiology**, v.62, n.3, p.197-209, 2000.

RODRIGUES-LAZARO, D. Evaluation of the expression stability for the analysis of PrfA-dependent gene expression in the pathogenic life cycle of *Listeria monocytogenes*. 2007. [comunicação pessoal].

ROGERS, H.W.; CALLERY, M.P.; DECK, B.; UNANUE, E.R. *Listeria monocytogenes* induces apoptosis of infected hepatocytes. **Journal of Immunology**, v.156, n.2, p.679-684, 1996.

ROTSTEIN, D.; PARODO, J.; TANEJA, R.; MARSHALL, J.C. Phagocytosis of *Candida albicans* induces apoptosis of human neutrophils. **Shock**, v.14, n.3, p.278-283, 2000.

ROUSSEAU, S.; OLIER, M.; LEMAITRE, J.P.; PIVETEAU, P.; GUZZO, J. Use of PCR-restriction fragment length polymorphism of *inlA* for rapid screening of *Listeria monocytogenes* strains deficient in the ability to invade Caco-2 cells. **Applied and Environmental Microbiology**, v.70, n.4, p.2180-2185, 2004.

RYSER, E.T.; MARTH, E.H., eds. **Listeria, listeriosis and food safety**. New York: Marcel Dekker, 1999. 738p. (Food science and technology, 92).

SALAMINA, G.; DALLE DONNE, E.; NICCOLINI, A.; PODA, G.; CESARONI, D.; BUCCI, M.; FINI, R.; MALDINI, M.; SCHUCHAT, A.; SWAMINATHAN, B.; BIBB, W.; ROCOURT, J.; BINKIN, N.; SALMASO, S. A foodborne outbreak of gastroenteritis involving *Listeria monocytogenes*. **Epidemiology and Infection**, v.117, n.3, p.429-436, 1996.

SANTOS, S.A.; ANDRADE, D.R.; ANDRADE JUNIOR, D.R. Rat hepatocyte invasion by *Listeria monocytogenes* and analysis of TNF-alpha role in apoptosis. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.47, n.2, p.73-80, 2005.

SCHLECH III, W.F.; LUO, Q.; FAULKNER, G.; GALSWORTHY, S. Interaction of *Listeria* species with human cell monolayers. **Clinical and Investigative Medicine**, v.17, n.1, p.9-17, 1994.

SCHLECH III, W.F. *Listeria* gastroenteritis--old syndrome, new pathogen. **New England Journal of Medicine**, v.336, n.2, p.130-132, 1997.

SCHLUTER, D.; DOMANN, E.; BUCK, C.; HAIN, T.; HOF, H.; CHAKRABORTY, T.; DECKERT-SCHLUTER, M. Phosphatidylcholine-specific phospholipase C from *Listeria monocytogenes* is an important virulence factor in murine cerebral listeriosis. **Infection and Immunity**, v.66, n.12, p.5930-5938, 1998.

SECHI, A.S.; WEHLAND, J.; SMALL, J.V. The isolated comet tail pseudopodium of *Listeria monocytogenes*: a tail of two actin filament populations, long and axial and short and random. **Journal of Cell Biology**, v.137, n.1, p.155-167, 1997.

SEELIGER, H.P.R.; JONES, D. Genus *Listeria*. In: BERGEY, D.H.; HOLT, J.G.; KRIEG, N.R., ed. **Bergey's manual systematic bacteriology**. Baltimore: Williams & Wilkins, 1986. v.2, p.1235-1245.

SGONC, R.; GRUBER, J. Apoptosis detection: an overview. **Experimental Gerontology**, v.33, n.6, p.525-533, 1998.

SHEEHAN, B.; KOCKS, C.; DRAMSI, S.; GOUIN, E.; KLARSFELD, A.D.; MENGAUD, J.; COSSART, P. Molecular and genetic determinants of the *Listeria monocytogenes* infectious process. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v.192, p.187-216, 1994.

SHEN, Y.; NAUJOKAS, M.; PARK, M.; IRETTON, K. InIB-dependent internalization of *Listeria* is mediated by the Met receptor tyrosine kinase. **Cell**, v.103, n.3, p.501-510, 2000.

SMITH, G.A.; PORTNOY, D.A. How the *Listeria monocytogenes* ActA protein converts actin polymerization into a motile force. **Trends in Microbiology**, v.5, n.7, p.272-276, 1997.

SMITH, G.A.; PORTNOY, D.A. The role of two phospholipases in the pathogenicity of *Listeria monocytogenes*. **Infectious Agents and Disease**, v.2, n.4, p.183-185, 1993.

SMITH, G.A.; MARQUIS, H.; JONES, S.; JOHNSTON, N.C.; PORTNOY, D.A.; GOLDFINE, H. The two distinct phospholipases C of *Listeria monocytogenes* have overlapping roles in escape from a vacuole and cell-to-cell spread. **Infection and Immunity**, v.63, n.11, p.4231-4237, 1995.

SOKOLOVIC, Z.; SCHULLER, S.; BOHNE, J.; BAUR, A.; RDEST, U.; DICKNEITE, C.; NICTERLEIN, T.; GOEBEL, W. Differences in virulence and in expression of PrfA and PrfA-regulated virulence genes of *Listeria monocytogenes* strains belonging to serogroup 4. **Infection and Immunity**, v.64, n.10, p.4008-4019, 1996.

STATISTICAL Package for the Social Sciences. Chicago: SPSS; 2004. Disponível em: <http://www.spss.com>. Acesso em 30 abr. 2007.

STEPHENS, J.C.; ROBERTS, I.S.; JONES, D.; ANDREW, P.W. Effect of growth temperature on virulence of strains of *Listeria monocytogenes* in the mouse: evidence for a dose dependence. **Journal of Applied Bacteriology**, v.70, n.3, p.239-244, 1991.

SUAREZ, M.; GONZALEZ-ZORN, B.; VEGA, Y.; CHICO-CALERO, I.; VAZQUEZ-BOLAND, J.A. A role for ActA in epithelial cell invasion by *Listeria monocytogenes*. **Cellular Microbiology**, v.3, n.12, p.853-864, 2001.

SUN, A.N.; CAMILLI, A.; PORTNOY, D.A. Isolation of *Listeria monocytogenes* small-plaque mutants defective for intracellular growth and cell-to-cell spread. **Infection and Immunity**, v.58, n.11, p.3770-3778, 1990.

SUPERTI, F.; PIETRANTONI, A.; DI BIASE, A.M.; LONGHI, C.; VALENTI, P.; TINARI, A. Inv-mediated apoptosis of epithelial cells infected with enteropathogenic *Yersinia*: a protective effect of lactoferrin. **Research in Microbiology**, v.156, n.5/6, p.728-737, 2005.

SWANSON, J.A.; BAER, S.C. Phagocytosis by zippers and triggers. **Trends in Cell Biology**, v.5, n.3, p.89-93, 1995.

TABOURET, M.; DE RYCKE, J.; DUBRAY, G. Analysis of surface proteins of *Listeria* in relation to species, serovar and pathogenicity. **Journal of General Microbiology**, v.138, n.4, p.743-753, 1992.

TABOURET, M.; DE RYCKE, J.; AUDURIER, A.; POUTREL, B. Pathogenicity of *Listeria monocytogenes* isolates in immunocompromised mice in relation to listeriolysin production. **Journal of Medical Microbiology**, v.34, n.1, p.13-18, 1991.

TAKEUCHI, K.; MYTLE, N.; LAMBERT, S.; COLEMAN, M.; DOYLE, M.P.; SMITH, M.A. Comparison of *Listeria monocytogenes* virulence in a mouse model. **Journal of Food Protection**, v.69, n.4, p.842-846, 2006.

TAKEUCHI, K.; SMITH, M.A.; DOYLE, M.P. Pathogenicity of food and clinical *Listeria monocytogenes* isolates in a mouse bioassay. **Journal of Food Protection**, v.66, n.12, p.2362-2366, 2003.

THERIOT, J.A. The cell biology of infection by intracellular bacterial pathogens. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v.11, p.213-239, 1995.

THERIOT, J.A.; MITCHISON, T.J.; TILNEY, L.G.; PORTNOY, D.A. The rate of actin-based motility of intracellular *Listeria monocytogenes* equals the rate of actin polymerization. **Nature**, v.357, n.6375, p.257-260, 1992.

TILNEY, L.G.; PORTNOY, D.A. Actin filaments and the growth, movement, and spread of the intracellular bacterial parasite, *Listeria monocytogenes*. **Journal of Cell Biology**, v.109, n.4, pt.1, p.1597-1608, 1989.

TILNEY, L.G.; TILNEY, M.S. The wily ways of a parasite: induction of actin assembly by *Listeria*. **Trends in Microbiology**, v.1, n.1, p.25-31, 1993.

TOMPKINS, D.S.; HUDSON, M.J.; SMITH, H.R.; EGLIN, R.P.; WHEELER, J.G.; BRETT, M.M.; OWEN, R.J.; BRAZIER, J.S.; CUMBERLAND, P.; KING, V.; COOK, P.E. A study of infectious intestinal disease in England: microbiological findings in cases and controls. **Communicable Disease and Public Health**, v.2, n.2, p.108-113, 1999.

UNITED STATES. Department of Agriculture. Economic Research Service. The Economics of Food, Farming, Natural Resources, and Rural America. Briefing Rooms. Economics of Foodborne Disease. *Listeria monocytogenes*. Disponível em: <http://www.ers.usda.gov/Briefing/FoodborneDisease/listeria.htm>. Acesso em: 12 dez. 2006.

VALENTI, P.; GRECO, R.; PITARI, G.; ROSSI, P.; AJELLO, M.; MELINO, G.; ANTONINI, G. Apoptosis of Caco-2 intestinal cells invaded by *Listeria monocytogenes*: protective effect of lactoferrin. **Experimental Cell Research**, v.250, n.1, p.197-202, 1999.

VAN ENGELAND, M.; NIELAND, L.J.; RAMAEKERS, F.C.; SCHUTTE, B.; REUTELINGSPERGER, C.P. Annexin V-affinity assay: a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure. **Cytometry**, v.31, n.1, p.1-9, 1998.

VAN LANGENDONCK, N.; BOTTREAU, E.; BAILLY, S.; TABOURET, M.; MARLY, J.; PARDON, P.; VELGE, P. Tissue culture assays using Caco-2 cell line differentiate virulent from non-virulent *Listeria monocytogenes* strains. **Journal of Applied Microbiology**, v.85, n.2, p.337-346, 1998.

VAUX, D.L.; KORSMEYER, S.J. Cell death in development. **Cell**, v.96, n.2, p.245-254, 1999.

VAZQUEZ-BOLAND, J.A.; DOMINGUEZ, L.; RODRIGUEZ-FERRI, E.F.; FERNANDEZ-GARAYZABAL, J.F.; SUAREZ, G. Preliminary evidence that different domains are involved in cytolytic activity and receptor (cholesterol) binding in listeriolysin O, the *Listeria monocytogenes* thiol-activated toxin. **FEMS Microbiology Letters**, v.53, n.1/2, p.95-99, 1989.

VAZQUEZ-BOLAND, J.A.; DOMINGUEZ-BERNAL, G.; GONZALEZ-ZORN, B.; KREFT, J.; GOEBEL, W. Pathogenicity islands and virulence evolution in *Listeria*. **Microbes and Infection**, v.3, n.7, p.571-584, 2001b.

VAZQUEZ-BOLAND, J.A.; FERRER, D.; ROCOURT, J. Heterogeneity of strains of *Listeria monocytogenes* isolated during an outbreak of listeriosis among adults in Valencia in 1989. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v.9, n.7, p.442-444, 1991.

VAZQUEZ-BOLAND, J.A.; KOCKS, C.; DRAMSI, S.; OHAYON, H.; GEOFFROY, C.; MENGAUD, J.; COSSART, P. Nucleotide sequence of the lecithinase operon of *Listeria monocytogenes* and possible role of lecithinase in cell-to-cell spread. **Infection and Immunity**, v.60, n.1, p.219-230, 1992.

VAZQUEZ-BOLAND, J.A.; KUHN, M.; BERCHE, P.; CHAKRABORTY, T.; DOMINGUEZ-BERNAL, G.; GOEBEL, W.; GONZALEZ-ZORN, B.; WEHLAND, J.; KREFT, J. *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. **Clinical Microbiology Reviews**, v.14, n.3, p.584-640, 2001a.

VEGA, Y.; DICKNEITE, C.; RIPIO, M.T.; BOCKMANN, R.; GONZALEZ-ZORN, B.; NOVELLA, S.; DOMINGUEZ-BERNAL, G.; GOEBEL, W.; VAZQUEZ-BOLAND, J.A. Functional similarities between the *Listeria monocytogenes* virulence regulator PrfA and cyclic AMP receptor protein: the PrfA* (Gly145Ser) mutation increases binding affinity for target DNA. **Journal of Bacteriology**, v.180, n.24, p.6655-6660, 1998.

VEGA, Y.; RAUCH, M.; BANFIELD, M.J.; ERMOLAEVA, S.; SCORTTI, M.; GOEBEL, W.; VAZQUEZ-BOLAND, J. A. New *Listeria monocytogenes* prfA* mutants, transcriptional properties of PrfA* proteins and structure-function of the virulence regulator PrfA. **Molecular Microbiology**, v.52, n.6, p.1553-1565, 2004.

VIEIRA, Sônia. **Análise de Variância (ANOVA)**. São Paulo: Atlas, 2006. 206 p.

WALZ, J.M.; GERHARDT, H.; FAIGLE, M.; WOLBURG, H.; NEUMEISTER, B. *Legionella* species of different human prevalence induce different rates of apoptosis in human monocytic cells. **APMIS: Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica**, v.108, n.6, p.398-408, 2000.

WEI, Z.; SCHNUPF, P.; POUSSIN, M.A.; ZENEWICZ, L.A.; SHEN, H.; GOLDFINE, H. Characterization of *Listeria monocytogenes* expressing anthrolysin O and phosphatidylinositol-specific phospholipase C from *Bacillus anthracis*. **Infection and Immunity**, v.73, n.10, p.6639-6646, 2005.

WERBROUCK, H.; GRIJSPEERDT, K.; BOTTELDOORN, N.; VAN PAMEL, E.; RIJSENS, N.; VAN DAMME, J.; UYTENDAELE, M.; HERMAN, L.; VAN COILLIE, E. Differential inlA and inlB expression and interaction with human intestinal and liver cells by *Listeria monocytogenes* strains of different origins. **Applied and Environmental Microbiology**, v.72, n.6, p.3862-3871, 2006.

WHEELER, J.G.; SETHI, D.; COWDEN, J.M.; WALL, P.G.; RODRIGUES, L.C.; TOMPKINS, D.S.; HUDSON, M.J.; RODERICK, P.J. Study of infectious intestinal disease in England: rates in the community, presenting to general practice, and reported to national surveillance. The Infectious Intestinal Disease Study Executive. **BMJ [British Medical Journal]**, v.318, n.7190, p.1046-1050, 1999.

WIEDMANN, M.; BRUCE, J.L.; KEATING, C.; JOHNSON, A.E.; MCDONOUGH, P.L.; BATT, C.A. Ribotypes and virulence gene polymorphisms suggest three distinct *Listeria monocytogenes* lineages with differences in pathogenic potential. **Infection and Immunity**, v.65, n.7, p.2707-2716, 1997.

YAMADA, F.; UEDA, F.; OCHIAI, Y.; MOCHIZUKI, M.; SHOJI, H.; OGAWA-GOTO, K.; SATA, T.; OGASAWARA, K.; FUJIMA, A.; HONDO, R. Invasion assay of *Listeria monocytogenes* using Vero and Caco-2 cells. **Journal of Microbiological Methods**, v.66, n.1, p.96-103, 2006.

ZHOU, X.; JIAO, X.; WIEDMANN, M. *Listeria monocytogenes* in the Chinese food system: strain characterization through partial actA sequencing and tissue-culture pathogenicity assays. **Journal of Medical Microbiology**, v.54, n.3, p.217-224, 2005.

ZYCHLINSKY, A.; SANSONETTI, P. Perspectives series: host/pathogen interactions: apoptosis in bacterial pathogenesis. **Journal of Clinical Investigation**, v.100, n.3, p.493-495, 1997.

ANEXO A

ANEXO A

Figura 48. Curvas de crescimento de cepas de *L. monocytogenes* a 37°C, sob agitação de 200 rpm, em um intervalo de 9 horas de incubação. Média de três experimentos em duplicata. 1/2B: sorotipo 1/2b (alimento); 1/2C: sorotipo 1/2c (ambiente); 4BENV: sorotipo 4b (ambiente); 4BCLIN: sorotipo 4b (sangue).