

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Faculdade de Nutrição
Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos



Dissertação de Mestrado

Efeito da co-cultura de *Lactococcus lactis subsp. lactis* (R7) em *Listeria monocytogenes*

Taiciane Gonçalves da Silva

Pelotas, 2021

Taiciane Gonçalves da Silva

Efeito da co-cultura de *Lactococcus lactis subsp. lactis* (R7) em *Listeria monocytogenes*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos da Universidade Federal de Pelotas, como requisito à obtenção do título de Mestre em Nutrição e Alimentos.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Simone Pieniz

Co-orientador: Prof. Dr. Augusto Schneider

Co-orientador: Prof. Dr. Wladimir Padilha da Silva

Pelotas, 2021

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

S586e Silva, Taiciane Gonçalves da

Efeito da co-cultura de *Lactococcus lactis subsp. lactis* (R7) em *Listeria monocytogenes* / Taiciane Gonçalves da Silva ; Simone Pieniz, orientadora ; Augusto Schneider, Wladimir Padilha da Silva, coorientadores. — Pelotas, 2021.
43 f. : il.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos, Faculdade de Nutrição, Universidade Federal de Pelotas, 2021.

1. Comunicação celular. 2. Bactérias ácido lácticas. 3. Mono-cultura. 4. Co-cultura. 5. Patogenicidade. I. Pieniz, Simone, orient. II. Schneider, Augusto, coorient. III. Silva, Wladimir Padilha da, coorient. IV. Título.

CDD : 641.1

Elaborada por Maria Inez Figueiredo Figas Machado CRB: 10/1612

Taiciane Gonçalves da Silva

Efeito da co-cultura de *Lactococcus lactis subsp. lactis* (R7) em *Listeria monocytogenes*

Dissertação aprovada como requisito para obtenção do grau de Mestre em Nutrição e Alimentos, Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos, Faculdade de nutrição, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 09/03/2021

Banca examinadora:

Prof. Dr. Simone Pieniz (Orientadora)
Doutora em Microbiologia Agrícola e do Ambiente pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

Prof. Dr. Eliezer Avila Gandra
Doutor em Ciência e Tecnologia Agroindustrial pela Universidade Federal de Pelotas (UFPel)

Dra. Isabela Schneid Kroning
Doutora em Ciência e Tecnologia de Alimentos pela Universidade Federal de Pelotas (UFPel)

Prof. Dr Robson Andrezza (Suplente)
Doutor em Ciência do solo pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

Agradecimentos

A minha família pelo apoio prestado ao longo desta jornada, em especial ao meu irmão Rodrigo o qual sempre esteve presente de forma ativa em todos os momentos. As amigas Amanda, Gabrielle, Thayane e Jessica que estiveram ao meu lado mesmo quando longe fisicamente.

Agradeço ainda minhas colegas de laboratório que sempre estiveram a toda disposição para me auxiliar além dos momentos de alegria que passamos. E sinceramente, sem vocês seria impossível a realização de qualquer trabalho Greice, Joseane e Paola.

A Professora Simone Pieniz pela oportunidade dada desde 2016, aos ensinamentos e por ter confiado na minha capacidade. Agradeço ainda, ao programa de Pós-graduação em nutrição e alimentos da Universidade Federal de Pelotas pela oportunidade e a CAPES pela bolsa de mestrado concedida.

A todos vocês meus sinceros agradecimentos!

Resumo

Silva, Taiciane Gonçalves. **Efeito da co-cultura de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (R7) em *Listeria monocytogenes***. 2021. nº 41. Dissertação. (Mestrado em Nutrição e Alimentos) – Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos, Faculdade de Nutrição, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2021.

Listeria monocytogenes é um micro-organismo patogênico o qual causa uma doença chamada listeriose que ocorre com a ingestão de alimentos contaminados. Para o controle da contaminação por este micro-organismo há evidências de que crescimento em co-cultura com bactérias ácido lácticas possa afetar seu crescimento. O mecanismo pelo qual este fenômeno ocorre é o *quorum sensing*, processo este de sinalização entre as células bacterianas o qual permite ocorrer um controle coletivo de expressão gênica sendo realizado por produção, secreção e detecção de auto-indutores como AI-2 sintetizado pela enzima luxS. Desta forma, o presente estudo tem como objetivo investigar a ação inibitória do *L. lactis* subsp. *lactis* (R7) sobre *L. monocytogenes* ATCC 7644 e o isolado *L. monocytogenes* L9 por meio do processo *quorum sensing*. Para isso, o estudo avaliou a multiplicação em mono-cultura e co-cultura, transcrição do gene *luxS* e investigação do efeito de *L. monocytogenes* mediada pelo gene *luxS* por *quorum sensing* em *L. lactis* subsp. *lactis* (R7). Por meio dos resultados, foi possível observar redução da multiplicação das duas cepas de *L. monocytogenes* quando em co-cultura com *L. Lactis* R7 e, ainda, as alterações de pH coincidentes com a redução de crescimento de ambas as cepas de *L. monocytogenes*, o que sugere um possível mecanismo de inibição que *L. lactis* R7 exerce na multiplicação do patógeno.

Palavras-chave: Comunicação celular. Bactérias ácido lácticas. Mono-cultura. Co-cultura. Patogenicidade.

Abstract

Listeria monocytogenes is a pathogenic microorganism which causes a disease called listeriosis that occurs with the ingestion of contaminated food. For the control of contamination by this microorganism there is evidence that growth in co-culture with lactic acid bacteria may affect its growth. The mechanism by which this phenomenon occurs is the *quorum sensing*, a signaling process between the bacterial cells which allows collective control of gene expression to occur, being carried out by production, secretion and detection of auto-inducers. Thus, the present study aims to investigate the inhibitory action of *L. Lactis* subsp. *lactis* (R7) on *L. monocytogenes* ATCC 7644 and from isolate *L. monocytogenes* L9 by means of the quorum sensing process. For this, the study evaluated the multiplication in mono-culture and co-culture, transcription of the *luxS* gene and investigation of the effect of *L. monocytogenes* mediated by the *luxS* gene by *quorum sensing* in *L. lactis* subsp. *lactis* (R7). With that, it was possible to observe the reduction of the multiplication curve of the two strains of *L. monocytogenes* when in co-culture with *L. Lactis* R7 and also the pH changes coinciding with the reduction of the curves of both *L. monocytogenes*, which suggests the use of some mechanism of inhibition of *L. lactis* R7 in the multiplication of the pathogen.

Keywords: Cellular communication. Lactic acid bacteria. Mono-culture. Co-culture. Pathogenicity.

Lista de Figuras

- Figura 1.** Curvas de crescimento de bacteriano. (A) *L. lactis*R7 mono- 29
cultura VS *L. lactis*R7 co-cultura 1; (B) *L. lactis*R7 mono-cultura
VS *L. lactis*R7 co-cultura 2; (C) *L. monocytogenes*L9 mono-
cultura VS *L. monocytogenes*L9 co-cultura 1 e (D) *L.*
*monocytogenes*ATCC 7644 mono-cultura VS *L.*
*monocytogenes*ATCC 7644 co-cultura 2
- Figura 2.** Curva de crescimento bacteriano e variação de pH. (A)Curva 30
de crescimento de *L. monocytogenes* L9 em mono-cultura e *L.*
*monocytogenes*L9 em co-cultura com *L. lactis*R7 e a variação
de pH da co-cultura. (B)Curva de crescimento de *L.*
*monocytogenes*ATCC 7644 em mono-cultura e *L.*
*monocytogenes*ATCC 7644 em co-cultura com *L. lactis*R7 e a
variação de pH da co-cultura

Listas de Tabelas

Tabela 1.	Oligonucleotídeos utilizados na análise da expressão gênica por qRT-PCR.....	24
Tabela 2.	Protocolos de tempo e de temperatura utilizados na identificação genotipagem.....	27
Tabela 3.	Fase de latência (λ), taxa de crescimento máximo (μ_{max}), densidade populacional máxima (Nmax) e densidade populacional final (N24h) de <i>L. lactis</i> R7, <i>L. monocytogenes</i> L9 e + <i>L. monocytogenes</i> ATCC 7644.....	28

Sumário

1. Introdução.....	11
2. Hipótese.....	12
3. Objetivos.....	12
1.1 Objetivo geral	12
4. Objetivos específicos.....	12
5. Revisão bibliográfica.....	12
5.1 <i>Lactococcus lactis</i>	12
5.2 <i>Listeria monocytogenes</i> x patogenicidade.....	14
5.3 <i>Quorum sensing</i>	17
5.4 <i>Quorum sensing</i> e sua relevância na microbiologia de alimentos.....	19
6. Materiais e métodos.....	20
6.1 Micro-organismos.....	20
6.2 Multiplicação em mono-cultura e co- cultura.....	21
6.3 Investigação do efeito de <i>L. monocytogenes</i> mediada pelo gene <i>luxS</i> por <i>quorum sensing</i> em <i>L. lactis</i> subsp. <i>Lactis</i> (R7).....	22
6.4 PCR em tempo real para a investigação do <i>quorum sensing</i>	22
6.5 Genotipagem.....	26
6.6 Análise estatística.....	27
7. Resultados.....	28
8. Discussão.....	31
9. Conclusão.....	33
Referências.....	33
Adendo.....	41

1. Introdução

Listeria monocytogenes é considerado um micro-organismo patogênico, causador de listeriose, uma doença grave, a qual pode ocasionar quadro de septicemia, gastroenterites, meningite e encefalite que podem levar ao óbito, principalmente, crianças, idosos e indivíduos imunocomprometidos (LOMONACO et al., 2015). Este micro-organismo é caracterizado como um bacilo Gram-positivo, anaeróbio facultativo e não esporulado, pode multiplicar-se entre as temperaturas de 1°C e 45°C, resistir ao pH entre 4,3 e 9,6 e concentração de sal (NaCl) de 10% (LOMONACO et al., 2015). Para que ocorra o controle de contaminação alguns estudos vêm evidenciando que a co-cultura deste patógeno com bactérias ácido lácticas (BAL) podem interferir na sua multiplicação (JENABIAN et al., 2011; FERRAZ, 2019).

BAL são constituídas em um grande grupo de bactérias benéficas à saúde que tem como produto final da fermentação o ácido lático (MOKOENA, 2017). Estas bactérias quando em convívio com bactérias patogênicas dispõem de mecanismos como competição de nutrientes, competição por sítios de adesão nas células epiteliais, estímulo à resposta imune do hospedeiro, produção de bacteriocinas e inibição de genes de virulência ou de expressão de proteínas (OELSCHLAEGGER, 2010; MOKOENA, 2017). Um dos mecanismos para o controle da multiplicação e inibição de genes de virulência é o *quorum sensing* (QS) (MAN et al., 2014; ZIEMICHÓD e SKOTARCZAK, 2017). Este é um processo de sinalização entre as células bacterianas o qual permite ocorrer um controle coletivo de expressão gênica quando há uma alta densidade populacional, sendo realizado por produção, secreção e detecção de autoindutores (AI) que são pequenas moléculas sinalizadoras (ZIEMICHÓD e SKOTARCZAK, 2017). Existem alguns grupos de AI sendo um deles o AI-2, o qual é formado via enzima LuxS (COUTO, 2018).

Um estudo realizado por Jia e colaboradores (2017), apresentaram relação do mecanismo de *quorum sensing* mediado pelo gene *luxS*. Além deste, outro estudo realizado Jenabian (2011) evidenciou que quando em co-cultura, *Lactobacillus acidophilus* reduziu a multiplicação da *L. monocytogenes* e que o nível de transcrição do gene *luxS* aumentou significativamente quando o *L. acidophilus* foi exposto a células viáveis de *L. monocytogenes*.

Desta forma, o presente estudo visa avaliar a influência do *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* (R7) (*L. lactis* R7) na inibição da multiplicação de *L. monocytogenes* mediada pelo gene *luxS*.

2. Hipótese

L. lactis R7 inibe a multiplicação de *L. monocytogenes* quando em co-cultura, por meio da enzima LuxS envolvida vias como o *quorum sensing*.

3. Objetivo geral

Investigar a ação inibitória de *L. Lactis* R7 na multiplicação de *L. monocytogenes* ATCC 7644 e de um isolado de *L. monocytogenes* em queijo minas artesanal (L9) em mono e co-cultura, por meio do processo da enzima LuxS envolvida vias como o *quorum sensing*.

4. Objetivos específicos

4.1 Avaliar a multiplicação bacteriana em mono e co-cultura em *L. lactis* R7, *L. monocytogenes* ATCC 7644 e *L. monocytogenes* L9;

4.2 Avaliar do pH de mono e co-cultura em *L. lactis* R7, *L. monocytogenes* ATCC 7644 e *L. monocytogenes* L9;

4.3 Avaliar o efeito de *L. monocytogenes* na transcrição do gene *luxS* em *L. lactis* R7.

5. Revisão bibliográfica

5.1 *Lactococcus lactis*

Bactérias ácido lácticas (BAL) são um grande grupo de bactérias Gram-positivas, não formadoras de esporos, catalase negativa, tolerantes a pH ácido, que apresentam como principal produto da fermentação da glicose o ácido láctico. São capazes de produção de ácidos orgânicos, como acetato, citrato, formato, lactato e succinato, capazes de reduzir o pH do meio (GÄNZLE, 2015.; MOKOENA, 2017). São homofermentativa aquelas que apresentam a capacidade de produzir apenas um substrato e heterofermentativas aquelas que na fermentação além de produzir ácido orgânico libera também etanol e CO₂(MADIGAN *et al.*, 2015;MOKOENA, 2017).

Além disso, apresentam capacidade de produção de bacteriocinas as quais irão apresentar capacidade antagonista frente a micro-organismos patogênicos como a *L.monocytogenes* (WANG *et al.*, 2018).

Esse grupo é formado pelos gêneros *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Aerococcus*, *Alloiococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*, *Dolosigranulum*, *Oenococcus*, *Vagococcus* e *Weissella*(ABDEL-RAHMAN *et al.*, 2013; MOKOENA, 2017).

O gênero *Lactococcus* é caracterizado como cocos Gram-positivos, anaeróbios facultativos, não esporulados e sem motilidade. Catalase negativa, oxidase negativa, com ótima temperatura para multiplicação a 30°C, não ocorrendo em pH 9,6 ou em 6,5% de NaCl. Este gênero de BAL apresenta algumas espécies, sendo a principal delas a espécie *lactis*, a qual é dividida em subespécies, dentre estas as principais *L. lactis* subsp. *lactis* e *L. lactis* subsp. *cremoris*, além de serem caracterizados como homolactato (PARAPOULI *et al.*, 2013; MOKOENA, 2017; SONG *et al.*, 2017).

L. lactis subsp. *lactis* apresenta potencial benéfico à saúde humana devido a sua capacidade probiótica, tanto individualmente quanto em conjunto com outros micro-organismos probióticos (SONG *et al.*, 2017). Além disso, é utilizada pela indústria de alimentos na produção de queijos macios, pois atua modificando as características sensoriais como aroma, cor e sabor devido sua acidificação, além de atuar como bioconservador por meio da produção de ácido láctico, acético e propiônico; antimicrobianos como as bacteriocinas, peróxidos de hidrogênio e diacetil (SONG *et al.*, 2017; KHEMARIYA *et al.*, 2017).

A nisina, principal bacteriocina produzida *L. lactis*, vem sendo utilizada como conservante natural de alimentos como requeijão, queijo fundido, queijos pasteurizados e queijo em ralado, pois apresenta atividade antimicrobiana contra patógenos como *L. monocytogenes* (SUGANTHI *et al.*, 2012, SONG *et al.*, 2017). Cada metabolito excretado por *L. lactis* irá exercer ação antagônica a outros micro-organismos, como a interferência dos ácidos orgânicos no funcionamento de reações metabólicas, sendo considerado assim, um obstáculo na multiplicação e na proliferação de micro-organismos, principalmente os patogênicos (SUSKOVIC *et al.*, 2010; KHEMARIYA *et al.*, 2017; WANG *et al.*, 2018).

5.2 *Listeria monocytogenes* x patogenicidade

L. monocytogenes caracterizado como um bacilo Gram-positivo, anaeróbio facultativo e não esporulado, possuindo flagelos peritríquios o que confere motilidade característica, quando incubado entre as temperaturas de 20°C e 25°C. Esse pode multiplicar-se entre as temperaturas de 1°C e 45°C, resistir ao pH entre 4,3 e 9,6 e a concentração de sal (NaCl) de 10% (LOMONACO *et al.*, 2015). A doença causada por este micro-organismo denomina-se listeriose, uma doença grave a qual pode ocasionar quadro de septicemia, gastroenterites, meningite e encefalite que podem levar ao óbito principalmente crianças, idosos e indivíduos imunocomprometidos (LOMONACO *et al.*, 2015; WAGNER *et al.*, 2008). No Brasil, esta não apresenta registros de notificação fidedignos sendo então subdiagnosticada e subnotificada subnotificada (BRASIL, 2013).

Essa bactéria tem sido encontrada em alimentos como leite e produtos lácteos não pasteurizados, carnes contaminadas, alimentos processados como queijos, manteigas e sorvetes contaminados (BENETTI *et al.*, 2013; MONTERO *et al.*, 2015). As cepas de *L. monocytogenes* podem ser classificadas em 13 sorotipos (1 / 2a, 1 / 2b, 1 / 2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4ab, 4b, 4c, 4d, 4e, 7); no entanto, Nos casos de listeriose humana os sorotipos apenas 1 / 2a, 1 / 2b, 1/2c e 4b são os causadores (CARTWRIGHT *et al.*, 2013).

A infecção por *L. monocytogenes* ocorre com a ingestão de alimentos contaminados e que após a chegada ao intestino, as células bacterianas ultrapassam a barreira intestinal e são disseminadas pela linfa até chegar a seus órgãos alvo, fígado e baço (RADOSHEVICH e COSSART 2017). Estas irão entrar nas células epiteliais por endocitose, mediada pelas internalinas (Inl), e em células fagocitárias, pelo processo de fagocitose, permanecendo dentro da célula em vacúolos (fagossomos) (PIZARRO *et al.*, 2012). Em seguida ocorrerá o rompimento dos fagossomos, o qual ocorre pela quebra destes por meio das listeriolisinas e fosfolipases (COELHO *et al.*, 2018). No citoplasma estes micro-organismos irão se multiplicar e realizar a polimerização de filamentos de actina os quais irão permitir a sua proliferação extracelular (RADOSHEVICH e COSSART, 2017).

Este processo descrito anteriormente ocorre devido aos fatores e virulência da *L. monocytogenes*, sendo alguns destes as internalinas A (InlA) e

B (InIB), a listeriolisina O (LLO), as fosfolipases A (PlcA) e B (PlcB), proteína indutora da síntese de actina, entre outros fatores (RADOSHEVICH e COSSART, 2017).

Em células não fagocitárias este micro-organismo terá sua invasão por meio das internalinas, principalmente pelas InIA e InIB as quais se ligam aos receptores de membrana chamados E-caderina, devido ao seu domínio N-terminal com muitas repetições de leucina (leu) e metionina (met) (COSSART E HELENIUS, 2014). A InIA atua realizando uma ancoragem na parede celular mediada pelo seu peptídeo sinalizador no terminal N (LRR); este por sua vez, se liga ao domínio EC1 da porção extracelular da E-caderina, sendo este processo importante para que ocorra a internalização deste micro-organismo (DELLAFIORA *et al.*, 2020). A InIB é uma proteína que ativa o receptor C-met assim promovendo a endocitose. Outras internalinas como InIC também atua no processo de invasão afetando a rigidez do citoesqueleto e sinalização imune inata (RADOSHEVICH e COSSART, 2017).

Após esta internalização ocorre a utilização da LLO e das PlcA e PlcB na ruptura do fagossomo, assim como outras pequenas moléculas mediadoras deste processo as quais são secretadas para que haja uma resposta conjunta das bactérias. Uma destas moléculas é o feromônio peptídeo A (PplA) o qual é codificado pela PlcA, e que, em células não fagocíticas, quando secretado, promove a fuga vacuolar sem afetar diretamente a perfuração do fagossomos, sinalizando e levando a secreção de substratos dependentes do sistema de secreção SecA2 da subunidade da translocase de proteínas. Estudos apontam que estes peptídeos podem auxiliar a *L. monocytogenes* na percepção de sua presença nos fagossomos e estimular a expressão das fosfolipases PlcA e PlcB. A secreção de PplA leva a uma cascata de sinalização que aumenta a dissolução da membrana vacuolar (VERA *et al.*, 2013; XAYARATH *et al.*, 2015; RADOSHEVICH e COSSART, 2017).

Após a fuga do fagossomo esta bactéria irá se multiplicar no citosol com o auxílio de Hpt o qual é um transportador de fosfato de hexose, e poderá causar alterações das funções na célula hospedeira, por meio da LLO ocorrendo alterações mitocondriais, no retículo endoplasmático e nos lisossomos (RADOSHEVICH e COSSART, 2017). Além destas alterações em organelas, ainda podem haver alterações transcricionais e epigenéticas da

célula hospedeira mediadas por nucleomodulinas, as quais são secretadas no citoplasma e irão atuar no núcleo da célula alterando a ativação da imunidade celular inata. Ainda, causará alterações nas histonas inibindo ou dificultando o acesso de fatores transcricionais a regiões do DNA (ESKANDARIAN *et al.*, 2013; RADOSHEVICH e DUSSURGET, 2016).

Este micro-organismo apresenta capacidade de polimerizar filamentos de actina os quais facilitam que este se movimente de célula a célula, isto se deve a proteína indutora de montagem de actina (ActA) a qual interage com o complexo ARP2/3 para que este processo, assim como as forminas induzem a nucleação de actina (TRUONG *et al.*, 2014).

Listeria monocytogenes apresenta diversos genes relacionados à sua virulência sendo o *prfA*, o principal gene regulador da ilha 1 de patogenicidade de *L. monocytogenes* (LIPI-1). Nesta estão contidos os genes *hly*, *plcA*, *plcB*, *actA* e *mpl*, expressando respectivamente, LLO, PlcA, PlcB, ActA e metaloproteinase de zinco (*mpl*). Além destes, o gene *prfA* ainda regula a expressão de *inlA*, *inlB*, *inlC* e *hpt* que encontram-se fora da LIPI-1 (VERA *et al.*, 2013; RADOSHEVICH e COSSART, 2017; JOHANSSON e FREITAG, 2019). PrfA é um fator de transcrição da proteína receptora cAMP (Crp) que é ativado alostericamente quando ocorre ligação do cofator após a entrada da bactéria na célula hospedeira, regulando seus genes alvos por meio de um sítio de ligação de DNA palindrômico de 14 pb (XAYARATH *et al.*, 2015; JOHANSSON e FREITAG, 2019).

A expressão do gene *prfA* é regulada por dois promotores, *prfAP1* e *prfAP2*, localizados antes do códon de iniciação da região transcricional de *prfA* (JOHANSSON e FREITAG, 2019). Além da regulação por *prfA* a virulência também é regulada pelo sistema de expressão de 17 genes, sendo estes dois componentes o *virR* e *virS* (KANG *et al.*, 2015). Um destes genes é o *dltA* o qual está envolvido na D-alanilação dos ácidos lipoteicoicos, assim como o gene *mprF* o qual modifica fosfolipídeos (VERA *et al.*, 2013).

Pequenos RNAs não codificantes podem auxiliar na expressão gênica. O Rli27 é um pequeno RNA, está envolvido na regulação da expressão da proteína Lmo0514, sendo uma importante proteína para virulência. ORli27 se liga e altera a estrutura do transcrito que libera um local de ligação para o

ribossomo fazendo com que ocorra um aumento na tradução de proteínas (QUEREDA et al., 2014; JOHANSSON e FREITAG, 2019).

5.3 Quorum sensing

O *quorum sensing* (QS) pode ser definido como um processo de comunicação entre as bactérias, no qual haverá modificação de comportamento coletivo em resposta a mudanças na densidade celular, sendo este mediado por moléculas sinalizadoras liberados pela membrana celular e que será responsável pela regulação da expressão de alguns genes em resposta a presença de outras bactérias (SOLA et al., 2012; ZIEMICHÓD e SKOTARCZAK, 2017).

Inicialmente ocorre a síntese destas moléculas sinalizadoras intracelularmente e são liberadas por difusão ou secretadas para o meio extracelular. Quando ocorre redução da densidade celular a concentração destas moléculas estará em baixo nível e não será detectada, porém quando houver aumento na densidade celular a concentração destas moléculas estará aumentada a um nível de detecção. Neste momento ocorrerá a ligação destas moléculas a seus receptores de membrana ou citoplasmáticos, modulando desta forma cascatas de sinalização, resultando em alterações na transcrição e na expressão de genes na população (COUTO, 2018; TAN et al., 2017).

O sistema QS apresenta diferença entre as bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. As Gram-positivas geralmente utilizam peptídeos e sistemas de dois componentes sendo estes receptores quinases ligados a membrana e fatores de transcrição citoplasmática que atuam na modulação da expressão gênica (MONNET et al., 2016). Já as Gram-negativas utilizam vários AI com heterogeneidade nas respostas de QS (PAPENFORT e BASSLER, 2016).

Os Ais mais estudados são os oligopeptídeos, AI-1 AI-2 e AI-3 utilizados por bactérias Gram-negativas e Gram-positivas (SOLA et al., 2012; COUTO, 2018). AI-1 é específico de bactérias Gram-negativas sendo sua molécula sinalizadora a N-3-oxohexanoyl-L-homoserina lactona e LuxR, ativador transcricional dos genes *lux* (PAPENFORT e BASSLER, 2016). AI-2 trata-se de um modo de sinalização interespecífica estando presente em Gram-negativas e Gram-positivas (ABISADO et al., 2018). O gene *luxS* codifica as enzimas envolvidas na via de reciclagem da S-adenosilmetionina (SAM), Pfs e Metk, que com a liberação do metil SAM gera S-adenosilhomocisteína (SAH),

convertida por Pfs em S-ribosilhomocisteína (SRH), sendo esta, substrato para a enzima LuxS. Esta catalisa a clivagem de SRH gerando homocisteína e liberando o 4,5-dihidroxi-2,3-pentanediona (DPD), o qual é uma molécula que cicliza diferentes isômeros quando em solução, por exemplo, os AI-2 (SOLA et al., 2012; PAPENFORT e BASSLER, 2016; COUTO, 2018). A enzima LuxS além de participar da síntese de AI-2 ainda apresenta um importante papel no metabolismo bacteriano, pois, faz parte da hidrólise da SAH em SAM, a qual é a principal via de formação de poliamina e síntese de vitaminas pelas bactérias (BONHOURE et al., 2015). Já os AI-3 são menos conhecidos e estão relacionados a regulação de fatores de virulência da EHEC e a expressão da toxina de Shiga (PAPENFORT e BASSLER, 2016).

As bactérias Gram-positivas irão se comunicar utilizando sistema de detecção. Os oligopeptídeos serão produzidos e transportados para o meio extracelular e o mecanismo de transmissão do sinal ocorrerá devido a uma cascata de fosforilação e defosforilação. Estes oligopeptídeos após atingirem uma determinada concentração serão detectados pela proteína cinasetransmembranar. A interação dos oligopeptídeos com a proteína cinase leva a uma cascata de reações que resultam na fosforilação da proteína reguladora que se ligará aos promotores dos genes alvo envolvidos no QS (LI e TIAN, 2012; ZIEMICHÓD e SKOTARCZAK, 2017).

Este mecanismo permite que as bactérias possam distinguir sua espécie de outras, visto que é um sistema intra e interespecie, fornecendo assim informações importantes sobre a espécie na qual está crescendo em conjunto e, assim, permitindo a modulação de seu comportamento (GRANDCLEMENT et al., 2016; COUTO, 2018). Estudos afirmam que essa comunicação celular leva a regulação de vários genes, alterando assim, processos como bioluminescência, produção de antimicrobianos, formação de biofilmes, crescimento, esporulação, transferência de plasmídeos, produção de enzimas hidrolíticas extracelulares, produção de bacteriocinas, toxinas e expressão de genes de virulência (JIA et al., 2017; LIU et al., 2017; MA et al., 2015).

5.4 Quorum sensing e sua relevância

Por ser um mecanismo envolvido em vários processos, o QS apresenta uma grande relevância a exemplo do estudo realizado por Jia e colaboradores

(2017) utilizaram o QS para investigar os mecanismos moleculares do gene *luxS* na síntese de bacteriocinas por BAL, e evidenciou que este apresenta relação com as vias metabólicas de nutrientes como carboidratos, proteínas e lipídios para a produção de bacteriocinas.

No estudo de Jianpeng e colaboradores (2018) utilizou *Lactobacillus plantarum* e *Lactobacillus casei* em co-cultura na conservação de camarões e pode concluir que a atividade antimicrobiana de *L. plantarum* aumentou em co-cultura com *Lactobacillus casei* isto coincidiu com o aumento da transcrição do gene *luxS*, sugerindo então que QS está envolvido no processo de síntese de bacteriocinas. Neste mesmo estudo, ainda foi possível evidenciar uma diminuição do pH significativamente maior em co-cultura do que quando comparado com a mono-cultura, assim como aumento na produção de ácido láctico. Isso sugere que além da produção de bacteriocinas o QS está envolvido na produção de ácidos orgânicos por BAL.

Além deste, Liu e colaboradores (2017) evidenciaram que o QS mediado por *luxS*- AI2, está envolvido na formação de biofilmes por atuar como modulador de genes envolvidos na síntese de biofilmes como *tuf*, *fba*, *gap*, *pgm*, *nfo*, *rib* e *rpoN* em *Lactobacillus paraplantarum*, sendo alguns destes genes responsáveis pela via glicolítica. As proteínas envolvidas na via glicolítica foram indicadas como reguladas positivamente de biofilme para *L.monocytogenes*no estudo de Zhou e colaboradores (2012).

Quanto a suscetibilidade a antimicrobianos, Ma e colaboradores (2015) investigaram a relação entre o sistema *luxS*/ AI-2 e suscetibilidade a antimicrobianos de *Streptococcusagalactiae* e evidenciaram que a cepa de gene *luxS* nocaute apresentou maior suscetibilidade a cefradina e norfloxacinado que a cepa não modificada. Isto indica que QS pode estar envolvido no mecanismo de resistência a antimicrobianos. Ainda, Ma e colaboradores (2017),avaliaram a resistência a ácido, adesão celular e níveis transcricionais de genes de virulência de *S.agalactiae*, este concluiu que em cepas onde o gene *luxS* foi inativado, houve uma redução significativa destas atividades quando comparado com cepas sem alterações gênicas.

Além das ações citadas anteriormente, um estudo evidenciou que a adesão células intestinais por *Lactobacillus plantarum* foi maior em cepas

isoladas quando comparadas com cepas que tinham exclusão da expressão do gene *luxS* (JIA et al., 2018).

QS é um mecanismo de grande interesse na microbiologia de alimentos por estar envolvidos nos processos relacionados a patogenicidade e deterioração de alimentos (GALIÉ et al., 2018). Jenabian (2011) em seu estudo realizado com o mono e o co-cultivo de *Lactobacillus acidophilus* e *L. monocytogenes* com a finalidade de testar se o gene *luxS* regularia positivamente a resposta a *L. monocytogenes*, constatou que quando em co-cultura juntamente com *L. acidophilus*, *L. monocytogenes* teve seu crescimento afetado e que o nível de transcrição do gene *luxS* aumentou significativamente quando o *L. acidophilus* foi exposto a células viáveis de *L. monocytogenes*.

Estudos mais antigos já vinham evidenciando a ocorrência deste mecanismo em produtos alimentícios, como estudo realizado por Lu e colaboradores (2004) no qual utilizaram produtos *in natura* e industrializados, a fim de comparar se estes teriam níveis de AI-2 semelhantes entre os grupos. Evidenciou-se ainda que haviam moléculas de AI-2 presentes em leite pasteurizado, o que permitiu concluir que o aquecimento a 80°C não destrói essas moléculas sinalizadoras, assim como proteases responsáveis pela deterioração do leite. Além do leite, o mesmo estudo ainda encontrou AI-2 em peixe congelado, em amostras de tomate, melão, cenoura e tofu.

Este mecanismo vem sendo investigado atualmente quanto sua relação com o processo de deterioração de alimentos (GALIÉ et al., 2018). Em biofilme há uma alta concentração de células bacterianas o que leva a ocorrência deste mecanismo com a finalidade de regular a expressão gênica conjunta destas células (BORGES et al., 2016). Autoindutor-2 está envolvido em mecanismos como na formação de biofilmes e na produção de fatores de virulência, em alguns casos, a exemplo do *Clostridium perfringens*, o QS controla a produção de toxinas via LuxS / AI-2 (ONTANI e SHIMIZU, 2016). Duanis-Assaf (2015) demonstrou em seu estudo, produção de biofilme por *Bacillus subtilis* induzida por lactose, onde em resposta a essa indução foi observado o aumento na produção de AI-2.

O QS é um mecanismo ainda pouco estudado e de acordo com o elucidado até então, está envolvido em diversas atividades microbianas e se

faz necessária a realização de mais estudos para esclarecimento de algumas lacunas.

6. Materiais e métodos

6.1 Micro-organismos

As bactérias utilizadas no presente estudo foram provenientes da coleção em estoque conservado do Laboratório de Nutrigenômica da Faculdade de Nutrição (FN), da Universidade Federal de Pelotas (UFPEL), sendo estas *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* (R7) (*L. lactis* R7), isolado de queijo ricota convencional, o qual foi depositado no GenBank sob número de acesso KF879126, *L. monocytogenes* ATCC 7644 e *L. monocytogenes* isolado de queijo minas artesanal (L9).

As análises foram realizadas nos Laboratórios de Microbiologia e Laboratório de Nutrigenômica da FN, UFPEL.

6.2 Multiplicação em mono-cultura e co-cultura

6.2.1 Mono-cultura

Os micro-organismos *L. lactis* R7, *L. monocytogenes* ATCC 7644 e *L. monocytogenes* L9 foram inocuados duas vezes antes da utilização em caldo *Brain Heart Infusion* (BHI) a 37°C *overnight*. Nos tempos(t) 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 e 24 horas, as amostras foram coletadas para monitoramento do crescimento das colônias e aferição do pH das culturas por fitas de pH (Macherey-Nagel MN), conforme realizado por Jenabian (2011). A multiplicação foi determinada por contagem em placas em agar *Man Rogosa Sharpe*(MRS) para *L. Lactis* R7 e ágar *Oxford* para *L. monocytogenes* ATCC 7644 e *L. monocytogenes* L9. Ambas *L. monocytogenes* foram incubadas aerobicamente em placas por 48 horas a 37°C; e *L. lactis* R7 foi incubada anaerobicamente a 37°C por 48 horas.

6.2.2 Co-cultura

Cem (100)mL de caldo BHI (pH 6,5) foram pré-aquecidos (30°C) inoculado 1mL de cada cultura cultivada *overnight* foram adicionados formando co-cultura 1 (R7+L9) e co-cultura 2 (R7+ *L. monocytogenes* ATCC 7644) incubadas a 37°C por 24 horas. Nos tempos (t) = 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 e 24 horas as amostras foram coletadas para monitoramento da multiplicação bacteriana e

alterações de pH. A multiplicação foi determinada por contagem em placas contendo agar MRS e *Oxford*.

6.2.3 Parâmetros de crescimento

Taxa específica de crescimento máxima (μ_{max}) foi determinada como o declive da região linear entre o início da contagem microbiana versus o tempo de multiplicação (Unidades Formadoras de Colônias (UFC)/ml ($\Delta \ln CFU ml^{-1} / \Delta t$) no tempo (t) = 2–6 h para *L. lactis*R7 e no t = 0-4 h para ambas *L. monocytogenes*). A densidade populacional final (N24h) foi determinada a partir da UFC/mL no último tempo de coleta e a densidade populacional máxima (Nmax) foi determinado como a maior UFC/mL coletada da curva.

6.3 Genotipagem

6.3.1 Extração de DNA

A análise de extração do DNA está sendo desenvolvida. Metodologia presente no adendo.

6.3.2 Amplificação do DNA por PCR

A análise de amplificação do DNA por PCR está sendo desenvolvida. Metodologia presente no adendo.

6.4 Investigação do efeito de *L. monocytogenes* mediado pelo gene *luxS* por quorum sensing em *L. lactis* subsp. *Lactis* (R7)

A análise da investigação do efeito de *L. monocytogenes* medido pelo gene *luxS* por quorum sensing em *L. lactis* subsp. *Lactis* (R70 está sendo desenvolvida. Metodologia presente no adendo.

6.5 PCR em tempo real para a investigação do quorum sensing

6.5.1 Extração do RNA

A análise de extração do RNA está sendo desenvolvida. Metodologia presente no adendo.

6.5.2 Análise da pureza e integridade do RNA extraído

A análise da pureza e integridade do RNA está sendo desenvolvida. Metodologia presente no adendo.

6.5.3 Síntese de DNA complementar (cDNA)

A análise da síntese do DNA complementar está sendo desenvolvida. Metodologia presente no adendo.

6.5.4 PCR quantitativo de transcrição reversa (qRT-PCR)

A análise da expressão do gene *luxS* está sendo realizada. Metodologia presente no adendo.

6.6 Análise estatística

Os dados foram analisados por meio de análise de variância bidirecional (Two-way ANOVA) e teste de Tukey a um nível de significância de 5% para comparação de médias, utilizando GraphpadPrism 5.0 (GraphPad, La Jolla, CA, EUA). Todas as análises foram realizadas em triplicata e com três repetições.

7. Resultados

7.1 Multiplicação em mono-cultura e co-cultura

As culturas avaliadas foram *L. lactis* R7, *L. monocytogenes* ATCC e *L. monocytogenes* L9, e co-cultura 1 (*L. lactis* R7+ *L. monocytogenes* L9) e co-cultura 2 (*L. lactis* R7+ *L. monocytogenes* ATCC). Parâmetros que descrevem a multiplicação bacteriana estão descritos na Tabela 3, onde pode-se observar uma redução do Nmax da *L. lactis*R7 em ambas as co-culturas em relação a mono-cultura ($p=0,0002$ e $p=0,0002$). Além disso, Nmax de co-culturas de *L. monocytogenes* ATCC 7644 e *L. monocytogenes* L9 também apresentaram redução em relação a suas mono-culturas ($p=0,0002$ e $p=0,0032$). Quando avaliado o N24h observou-se redução significativa nas co-culturas de *L. monocytogenes* ATCC 7644 e *L. monocytogenes* L9 quando comparado com suas mono-culturas ($p=0,0121$ e $p=0,0338$).

Tabela 3. Fase de latência (λ), taxa de crescimento máximo (μ_{max}), densidade populacional máxima (Nmax) e densidade populacional final (N24h) de *L. lactis*R7, *L. monocytogenes*L9 e *L. monocytogenes* ATCC 7644.

Micro-organismos	Cultura	λ (h)	μ_{max} (h ⁻¹)	Nmax (Log UFC/mL ⁻¹)	N24h (Log UFC/mL ⁻¹)
R7	Mono-cultura	0,25±0,015	0,72±0,002	8,70±0,005	8,41±0,040
	Co-cultura 1	0,19±0,020	0,88±0,001	7,61±0,010*	7,56±0,010
	Co-cultura 2	0,27±0,010	0,81±0,006	7,66±0,030*	7,66±0,030
L9	Mono-cultura	0,22±0,085	0,78±0,015	7,53±0,010	7,48±0,020
	Co-cultura 1	0,15±0,045	0,88±0,000	6,90±0,140**	6,00±0,001****
ATCC	Mono-cultura	0,12±0,015	0,85±0,010	7,45±0,000	7,28±0,010
	Co-cultura 2	0,06±0,025	0,88±0,075	6,95±0,075*	6,30±0,430***

Dados expressos em médias e desvio padrão com valor de $p=0,0002^$, $p=0,0032^{**}$, $p=0,0121^{***}$ e $p=0,0338^{****}$.

A multiplicação e/ou crescimento celular está apresentada na Figura 1, onde observa-se redução de *L. Lactis*R7 tanto na co-cultura 1 quanto na co-cultura 2 em relação a sua mono-cultura, a partir do tempo de 4 horas ($p<0,004$ e $p<0,001$) até as 24 horas ($p=0,020$ e $p<0,040$), apresentando seus picos máximos em 12 horas sendo 8,70 Log UFC/mL⁻¹ para a mono-cultura. Já na co-

cultura 1 *L. Lactis*R7 apresentou seu pico máximo as 8 horas sendo de 7,61 7,66 Log UFC/mL⁻¹ enquanto que a co-cultura 2 obteve se pico máximo as 24 horas sendo 7,66 Log UFC/mL⁻¹. *Listeria monocytogenes* L9 em co-cultura apresentou redução da multiplicação em relação a sua mono-cultura, sendo observado o pico máximo em co-cultura de 6,9 Log UFC/mL⁻¹ em 4 horas (p=0,0009) e em mono-cultura o pico máximo foi de 7,50 Log UFC/mL⁻¹ em 8 horas (p=0,0003). *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 apresentou maior acentuação no declive de crescimento em co-cultura, visto que no tempo de 24 horas a mono-cultura apresentava 7,49 Log UFC/mL⁻¹ enquanto que na co-cultura foi observado 6,3 Log UFC/mL⁻¹ (p<0,001).

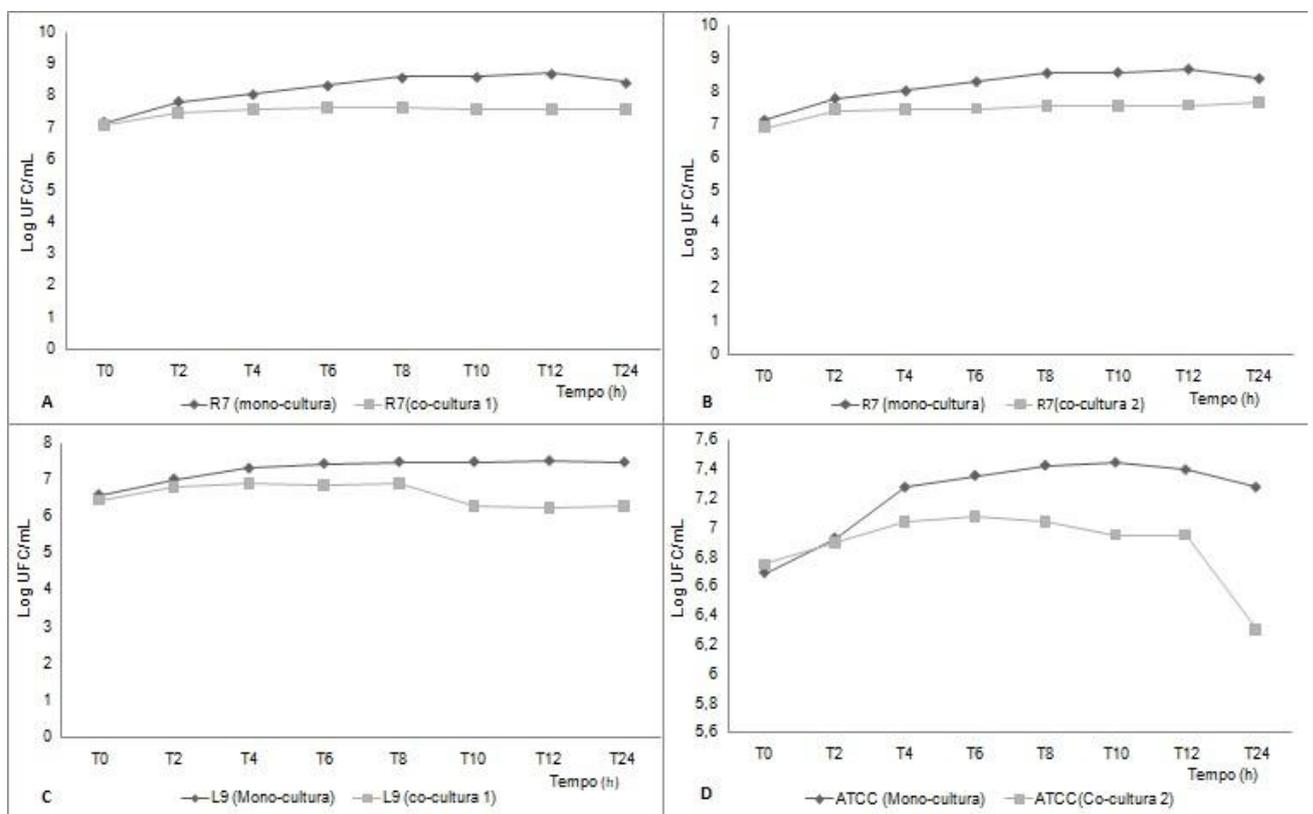


Figura 1. Curvas de crescimento de bacteriano. (A) *L. lactis* R7 mono-cultura VS *L. lactis* R7 co-cultura 1; (B) *L. lactis*R7 mono-cultura VS *L. lactis*R7 co-cultura 2; (C)*L. monocytogenes*L9 mono-cultura VS *L. monocytogenes*L9 co-cultura 1 e (D) *L. monocytogenes* ATCC 7644 mono-cultura VS *L. monocytogenes* ATCC 7644co-cultura 2.

7.2 Multiplicação em mono-cultura e co-cultura VS pH

Quando analisadas as curvas de crescimento e a curva de pH das co-culturas pode-se observar que *L. monocytogenes* L9 a partir do tempo de 4 horas, apresentou declínio no crescimento em relação a sua mono-cultura e, da mesma forma, foi observada diminuição do pH de 6,5 para 5,5. O mesmo pode ser observado com *L. monocytogenes* ATCC 7644 onde a partir do tempo de 6 horas observou-se declínio no crescimento em relação a sua mono-cultura e foi acentuado no intervalo entre 12 horas ($6,95 \text{ Log UFC/mL}^{-1}$) e 24 horas ($6,3 \text{ Log UFC/mL}^{-1}$), onde o pH também reduziu de 5,5 para 5.

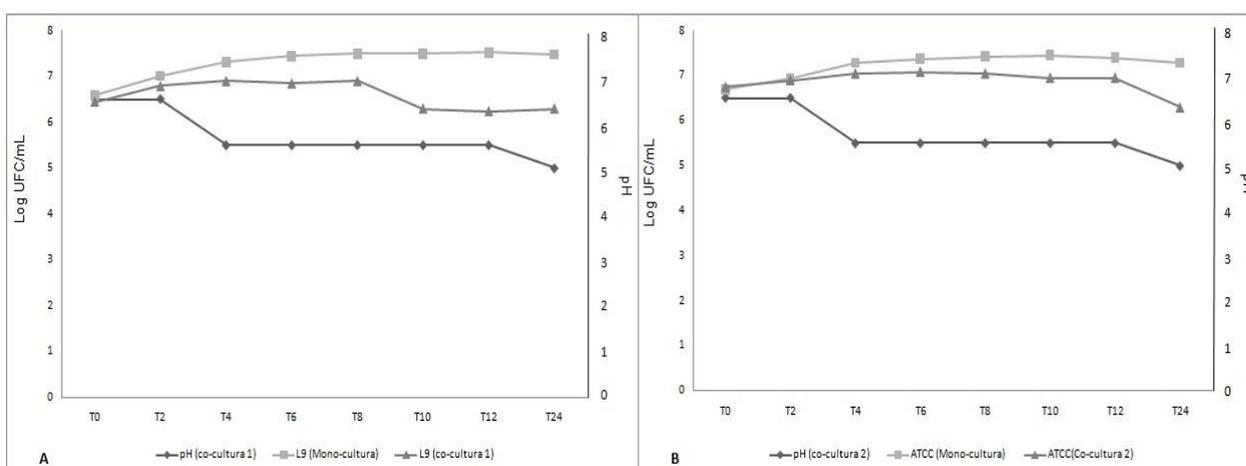


Figura 2. Curva de crescimento bacteriano e variação de pH. **(A)** Curva de crescimento de *L. monocytogenes* L9 em mono-cultura e *L. monocytogenes* L9 em co-cultura com *L. lactis* R7 e a variação de pH da co-cultura. **(B)** Curva de crescimento de *L. monocytogenes* ATCC 7644 em mono-cultura e *L. monocytogenes* ATCC 7644 em co-cultura com *L. lactis* R7 e a variação de pH da co-cultura.

7.3 Genotipagem

A análise de genotipagem está sendo desenvolvida. Dados ainda não conclusos.

7.4 Expressão de genes por qRT-PCR

A análise da expressão do gene *luxS* está sendo realizada. Dados não concluídos até o presente momento.

8. Discussão

Os parâmetros de multiplicação bacteriana apresentados no presente estudo evidenciaram uma redução significativa de todas as bactérias em co-cultura quando comparadas a suas mono-culturas. Ao analisarmos os resultados de outros estudos, *L. monocytogenes* em co-cultura com *Lactococcus piscium* apresentou redução de sua multiplicação e redução em seu μ_{max} , embora no estudo atual este parâmetro não apresentou diferença significativa, outros parâmetros como o N_{max} e N_{24h} evidenciaram uma redução tanto nas cepas de *L. monocytogenes* como *L. lactis* R7 (SARAOUI et al., 2016). Entretanto, estudo realizado por Jenabian (2011), o qual utilizou *L. acidophilus* e *L. monocytogenes*, apresentou resultados semelhantes, porém, *L. acidophilus* não obteve redução do N_{max} como *L. lactis* R7. No presente estudo esta redução da multiplicação de *L. lactis* R7 em co-culturas pode ter ocorrido devido competição por nutrientes (CAMPAGNOLLO et al., 2018) em co-cultura desde as 4 horas onde a diferença inicial foi de $p < 0,004$ na co-cultura 1 e $p < 0,001$ na co-cultura 2.

Já as diferenças apresentadas pelas cepas de *L. monocytogenes* em co-cultura com as suas mono-culturas foram desde as 4 horas tanto de *L. monocytogenes* L9 quanto *L. monocytogenes* ATCC 7644. Estudo realizado por Costa (2016) co-inoculou uma cepa de *Lactococcus lactis* com *L. monocytogenes* e, assim, como no presente estudo, também evidenciou redução na multiplicação de *L. monocytogenes*. Outro estudo realizado por Garcia e colaboradores (2018), utilizando *L. monocytogenes* em co-cultura com *Lactobacillus Plantarum*, evidenciaram que depois de 6 horas apresentou uma redução de 6,39 Log UFC/mL para 4,84 Log UFC/mL.

Quando comparadas as curvas de multiplicação com o pH, *L. monocytogenes* L9 apresentou redução coincidente ao pH no tempo de 4 horas. O mesmo pode ser observado com *L. monocytogenes* ATCC 7644, que a partir do tempo de 6 horas também apresentou redução da sua multiplicação, enquanto que a *L. Lactis* R7 apresentou multiplicação celular crescente mesmo com as alterações de pH. Garcia e colaboradores (2018) realizaram estudo de

co-cultura entre duas cepas de *Lactobacillus plantarum* frente a *L. monocytogenes*, e a mesma apresentou redução do pH das co-culturas similar ao resultado encontrado no presente estudo, onde inicialmente o pH foram 6,39 e 6,38 e ao término o pH foi de 4,84 e 4,57 em cada uma das co-culturas.

As BAL apresentam capacidade de produção de ácidos orgânicos, como acetato, citrato, formato, lactato e succinato, capazes de reduzir o pH do meio. A glicose é o principal substrato que as BAL utilizam para a produção de ácido láctico, porém as homofermentativas, bactérias que apresentam apenas ácido como produto da fermentação, podem fermentar hexose e produzir ácido láctico (MADIGAN et al., 2015; GÄNZLE, 2015). Este fato, então, pode ser uma das causas da redução de pH durante o experimento.

Aryani e colaboradores (2015) quantificaram a variabilidade de cepas de *L. monocytogenes* quanto a sua multiplicação e elucidaram que todas as cepas apresentaram menor μ_{max} em pH 4 e 5, o que reafirma o comportamento de *L. monocytogenes* com multiplicação entre pH 4 e 9 (LOMONACO et al., 2015).

Outro mecanismo pelo qual as BAL podem atuar frente a outras bactérias é por produção de bacteriocinas, as quais, alguns autores vêm evidenciando seus efeitos sobre bactérias patogênicas como a *L. monocytogenes* (WORAPRAYOTE et al., 2016; WANG et al., 2018).

Em contrapartida, estudo realizado por Saraoui e colaboradores (2016), os quais analisaram os mecanismos inibitórios de *L. piscium* contra *L. monocytogenes*, observaram inibição da multiplicação de *L. monocytogenes* de 4 para 3 log UFC/g⁻¹ após 24 horas, porém, esta inibição não foi devida a produção de ácidos orgânicos ou bacteriocinas, mas provavelmente por competição por nutrientes. Além disso, essa inibição foi observada apenas quando as células estavam em contato, o que leva a hipótese de algum mecanismo molecular por contato entre as células dos dois micro-organismos.

Um mecanismo molecular que pode apresentar alterações na curva de pH é QS. Gu e colaboradores (2018) evidenciaram a expressão do gene *luxS* do *L. fermentum* principalmente com a redução de pH. Estudo realizado por Jenabian e colaboradores (2011), analisou o mecanismo de QS entre *Lactobacillus acidophilus* e *L. monocytogenes*, evidenciaram além de alterações na multiplicação e pH semelhantes ao presente estudo, já

comentadas anteriormente, expressão do gene *luxS* quando células de *Lactobacillus. acidophilus* entraram em contato com células de *L. monocytogenes*, não evidenciando aumento na expressão de *luxS* quando *Lactobacillus. acidophilus* foi exposto as células não viáveis e ao meio de cultura com metabólitos de *L. monocytogenes*.

9. Conclusão

Por meio dos resultados obtidos conclui-se que *L. lactis* R7 apresentou ação inibitória tanto à *L. monocytogenes* ATCC 7644 quando ao isolado *L. monocytogenes* L9. Além disso, apresentou alteração de pH o que dificultou a multiplicação das cepas de *L. monocytogenes*. Por fim, baseado nos resultados encontrados neste estudo e, em estudos anteriores relatados anteriormente, esta inibição da multiplicação de *L. monocytogenes* pode ter ocorrido devido a produção de ácidos sendo este um processo relacionado como mecanismos moleculares como o QS.

Referências

- ABDEL-RAHMAN, M. A.; TASHIRO, Y.; SONOMOTO, K. Recent advances in lactic acid production by microbial fermentation processes. **Biotechnol.** v.31, p.877–902, 2013.
- ABISADO, R.G.; BENOMAR, S.; KLAUS, J.R.; DANDEKAR, A.A.; CHANDLER, J.R. Bacterial quorum sensing and microbial community interactions. **MBio**, v.9, n.3, 2018.
- ARYANI, D. C.; DENBESTEN, H. M. W.; HAZELEGER, W. C.; ZWIETERING, M. H. Quantifying strain variability in modeling growth of *Listeria monocytogenes*. **International Journal of Food Microbiology**, v.208, p.19–29, 2015.
- BENETTI, T. M.; MONTEIRO, C. L. B.; BEUX, M. R.; ABRAHÃO, W. M. Enzyme linked immunosorbent assays for the detection of *Listeria* sp. and *Salmonella* sp. in sausage: A comparison with conventional methods. **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 44, n. 3, p. 791-794, 2013.
- BONHOUR, N; BYRNES, A.; MOIR, R.D.; HODROJ, W.; PREITNER, F.; PRAZ, V.; MARCELIN, G.; JR, CS.; MARTINEZLOPEZ, N.; SINGH, R. Loss of the Rna polymerase III repressor Maf1 confers obesity resistance. **Genes Dev**, v. 29, n. 9, p.934–947, 2015.

BORGES, A.; ABREU, A.C.; DIAS, C.; SAAVEDRA, M.J.; BORGES, F.; SIMOES, M. New perspectives on the use of phytochemicals as an emergent strategy to control bacterial infections including biofilms. **Molecules**, v.21, n. 7, 2016.

Brasil, estado de São Paulo http://www.saude.sp.gov.br/resources/cve-centro-de-vigilancia-epidemiologica/areas-de-vigilancia/doencas-transmitidas-por-agua-e-alimentos/doc/bacterias/2013listeria_monocytogenes.pdf. Acessado em: 15/12/2019

CAMPAGNOLLO, F. B.; MARGALHO, L. P.; KAMIMURA, B. A.; FELICIANO, M. D.; FREIRE, L.; LOPES, L. S.; SANT, A. S. Selection of indigenous lactic acid bacteria presenting anti-listerial activity, and their role in reducing the maturation period and assuring the safety of traditional Brazilian cheeses. **Food Microbiology**, v. 73, p. 288–297, 2018.

CARTWRIGHT, E. J.; JACKSON, K. A.; JOHNSON, S. D.; GRAVES, L. M.; SILK, B. J.; MAHON, B. E. Listeriosis outbreaks and associated food vehicles, United States, 1998-2008. **Emerg. Infect. Dis.** v.19, p.1–9, 2013.

CASALTA, E.; MONTEL, M.C. Safety assessment of dairy microorganisms: The Lactococcus genus. **International Journal of Food Microbiology**. v.126, p. 271–273, 2008.

COELHO, C.; BROWN, L.; MARYAM, M.; VIJ, R.; SMITH, D.F.Q.; BURNET, M.C.; KYLE, J.E.; HEYMAN, H.M.; RAMIREZ, J.; ROSALES, R.P.; LAUVAU, G.; NAKAYASU, E.S.; BRADY, N.R.; BRADY, A.H.; COPPENS, I.; CASADEVALL, A. Listeria monocytogenes virulence factors, including Listeriolysin O, are secreted in biologically active Extracellular Vesicles. **J. Biol. Chem**, v.294, n. 4, p.1202-1217, 2018.

CORR, S.C.; HILL, C.; GAHAN, C.G. Understanding the mechanisms by which probiotics inhibit gastrointestinal pathogens. **Advances in Food and Nutrition Research**. n.56, p.1–15, 2009.

COSSART, P.; HELENIUS, A. Endocytosis of viruses and bacteria. **Cold Spring Harbor Persp. Biol.** v.6, p.1-28, 2014.

COSTA, A.C.C.C. **Isolamento de bactérias lácticas produtoras de bacteriocinas e avaliação de sua atividade frente a patógenos alimentares em sistema de bioconservação de produto lácteo**. Goiânia. 2016. 68f. Dissertação de mestrado. Programa de Pós-Graduação em Ciência e

Tecnologia de Alimentos da Escola de Agronomia da Universidade Federal de Goiás.

COUTO, Samuel. **Influência dos sistemas de Quorumsensing AI-1/AI-2/AI-3 nos fatores de virulência de EPEC atípica de origem animal**. 2018. 151f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Instituto de ciências biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

DELLAFIORA, L.; FILIPELLO, V.; DALL'ASTA, C.; FINAZZI, G.; GALAVERNA, G.; LOSIO, M.N. A Structural Study on the Listeria Monocytogenes Internalin A—Human E-cadherin Interaction: A Molecular Tool to Investigate the Effect of Missense Mutations. **Toxins (Basel)**, v. 60, p 1-11, 2020.

DUANIS-ASSAF, D.; STEINBERG, D.; CHAI, Y.; SHEMESH, M. The luxS based quorum sensing governs lactose induced biofilm formation by *Bacillus subtilis*. **Front. Microbiol.**, v.6, n.1517, 2016.

ESKANDARIAN, H.A.; IMPENS, F.; NAHORI, M.A.; SOUBIGOU, G.; COPPÉE, J.; COSSART, P.; HAMON, M.A. A role for SIRT2-dependent histone H3K18 deacetylation in bacterial infection. **Science** v. 341, 2013.

FERRAZ, S. **Papel da interação entre bactérias lácticas isoladas de alimentos na produção de bacteriocinas**. 2019. 65f. Dissertação (mestrado). Programa de pós-graduação em ciência de alimentos. Faculdade de ciências farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

GALIÉ, S.; GUTIÉRREZ, C.G.; MIGUÉLEZ, E.M.; VILLAR, C.J.; LOMBÓ, F. Biofilms in the food industry: Health aspects and control methods. **Frontiers in Microbiology**, v.9, n. 898, 2018.

GÄNZLE, M. G. Lactic acid metabolism revisited: Metabolism of lactic acid bacteria in food fermentations and food spoilage. **Current Opinion in Food Science**, v. 2, p.106–117, 2015.

GARCÍA, J.P.; GIL, J.E.; BOTERO, S.; VALENCIA, F.E.G. Growth control of *Listeria monocytogenes* in co-culture with *Lactobacillus plantarum*. **Rev. Colomb. Biotecnol.** v. 20, n. 2, p. 68-77, 2018.

GOPU, V.; SHETTY, P.H. Cyanidin inhibits quorum signaling pathway of a food borne opportunistic pathogen. **Journal of Food Science and Technology**, v.53, n.2, p. 968-976, 2016.

GRANDCLEMENT, C.; TANNIERES, M.; MORERA, S.; DESSAUX, Y.; FAURE, D. Quorumquenching: role in natureandapplieddevelopments. **FEMS Microbiol** v.40, n.1, p. 86–116, 2016.

GU, Y.; TIAN, J.; WU, R.; HE, Y. The response ofLuxS/AI-2 quorumsensing in Lactobacillusfermentumtochanges in environmentalgrowthconditions. **Springer**, 2018.

HANSEN, G.; YEUNG, V.P.; BERRY,G.; UMETSU, D.T.; DEKRUYFF, R.H. Vaccinationwithheat-killedListeria as adjuvant reverses establishedallergen-inducedairwayhyperreactivityandinflammation: role ofcd* t cellsand IL-18. **JournalofImmunology**. v. 164, p-223-230, 2000.

JENABIAN, S.M.; VOGENSEN, F.K.; JESPERSEN, L. The quorumsensingluxS gene isinduced in *Lactobacillusacidophilus*NCFM in response to*Listeriamonocytogenes*. **InternationalJournalofFoodMicrobiology**. v.149, p.269–273, 2011.

JIANPENG, L.; XIAOYUAN, Y.; GUOCUI. S.; JING. C.; ZUNYING. L.; MINGYONG. Z. Cooperation of lactic acid bacteria regulated by the AI-2/LuxS system involve in the biopreservation of refrigerated shrimp. **Food Research International**. v. 120, p-679-687, 2018.

JOHANSSON, J.; FREITAG, N.E. RegulationofListeriamonocytogenesVirulence. **Microbiolspec**, p. 836-850, 2019.

KANG, J., WIEDMANN, M., BOOR, K. J. BERGHOLZ, T. M. VirR-mediatedresistanceofListeriamonocytogenesagainstfoodantimicrobialsandcross-protectioninducedbyexposuretoorganicacidsalts. **Appl. Environ. Microbiol**. v.81, p. 4553–4562, 2015.

KHEMARIYA, P.; SINGH, S.; NATH, G.; GULATI, A.K. ProbioticLactococcuslactis: A Review. TurkishJournalofAgriculture .**Food Science and Technology**. v. 5, n.6, p.556-562, 2017.

LI, Y.H.; TIAN, X. Quorumsensingandbacterial social interactions in biofilms. **Sensors**, v.12, p. 2519– 2538, 2012.

LIU, L.; WU, R.; ZHANG, J.; LI, P. Over expressionof*luxS*Promotes Stress ResistanceandBiofilmFormationof*Lactobacillusparaplantarum* L-ZS9 byRegulatingthe Expression ofMultiple Genes. **Frontiers in Microbiology**, v.9, 2018.

LIU, L.; WU, R.; ZHANG, J.; SHANG, N.; LI, P. D-Ribose Interferes with Quorum Sensing to Inhibit Biofilm Formation of *Lactobacillus paraplantarum* L-ZS9. **Front. Microbiol.**, v.8, n. 1860, p.1-13, 2017.

LIVAK, K.J.; SCHMITTEN, T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real Time Quantitative PCR and the 2^{-ΔΔCT} Method. **Elsevier Science**. V.25, p.402–408, 2001

LOMONACO, S; NUCERA, D; Filipello, V. The evolution and epidemiology of *Listeria monocytogenes* in Europe and the United States. **Infect Genet Evol**, v.35, p.172–83, 2015.

LU, L.; HUME, M. E.; PILLAI, S. D. Autoinducer-2-like activity associated with foods and its interaction with additives. **Journal of food protection**, Ames, v. 67, n. 7, p. 1457-1462, 2004.

MA, Y.P.; KE, H.; HAO, L. LuxS/AI-2 *quorum sensing* is involved in antimicrobial susceptibility in *Streptococcus agalactiae*. **Fish pathology**, v.50, n.1, p. 8-15, 2015.

MA, Y.; HAO, L.; KE, H.; LIANG, Z.; MA, J.; LIU, Z.; LI, Y. *LuxS/AI-2* in *Streptococcus agalactiae* reveals a key role in acid tolerance and virulence. **Res. Vet. Sci.**, v.115, p. 501-507, 2017.

MACHADO, I.; SILVA, L.R.; GIAOURIS, E.D.; MELO, L.F.; SIMÕES, M. Quorum sensing in food spoilage and natural-based strategies for its inhibition. **Food Research International**, v.127, 2020.

MADIGAN, M. T. MARTINKO, J. M.; STAHL, D. A.; CLARK, D. P. **Brock Biology of Microorganisms**. Francisco: Benjamin Cummings 13th Edition, 2015, 375 p.

MOKOENA, M.P. Lactic Acid Bacteria and Their Bacteriocins: Classification, Biosynthesis and Applications against Uropathogens: A Mini-Review. **Molecules**. v. 8, n. 1255, p. 22-26, 2017

MONNET, V., JUILLARD, V., GARDAN, R. Peptide conversations in Gram-positive bacteria. **Critical Reviews in Microbiology**, v.3, n.42, p. 339–351, 2016.

MONROY, D.M.C.; CASTRO, B.T.; FERNÁNDEZ, P.F.J.; MAYORGA, R.L. Revisión bibliográfica: Bacteriocinas producidas por bacterias probióticas. **Contacto S**, v. 73, p. 63-72, 2009.

MONTEIRO, L.R.L.; MESQUITA, A.J.; ANDRÉ, M.C.D.P.B.; CARDOSO, J.L. Molecular characterization of *Listeria monocytogenes* isolated from animal products in a city of Northern Brazil. **Ciência Rural**, v.43, p.1443–1448, 2013.

PAPENFORT, K.; BASSLER, B.L. Quorum sensing signal – response systems in Gram-negative bacteria. **Nature Reviews Microbiology**, v.14, p. 576–588, 2016.

PARAPOULI, M.; DELBES-PAUS, C.; KAKOURI, A.; KOUKKOU, A.I.; MONTEL, M.C.; SAMELIS, J. Characterization of a wild, novel *nisin* a-producing *Lactococcus* strain with an *L. lactis* subsp. *Cremoris* genotype and an *L. lactis* subsp. *Lactis* phenotype, isolated from Greek raw milk. **Appl Environ Microbiol**, v.79, n34, p.76–84, 2013.

PIZARRO, J.C.; KÜHBACHER, A.; COSSART, P. Entry of *Listeria monocytogenes* in mammalian epithelial cells: a new view. **Cold Spring Harbor Pers Med**. n. 2, v.11, p 1-17, 2012.

ONTANI, K.; SHIMIZU, T. Regulation of toxin production in *Clostridium perfringens*. **Toxins**, v.8, n.207, 2016

QUEREDA, J. J., ORTEGA, A. D., PUCCIARELLI, M. G. & GARCIA-DEL PORTILLO, F. The *Listeria* small RNA Rli27 regulates a cell wall protein in eukaryotic cells by targeting a long 5' UTR variant. **PLoS Genet**. v.10, n.10, 2014.

RADOSHEVICH, L.; DUSSURGET, O. Cytosolic innate immune sensing and signal in upon infection. **Front. Microbiol**. v.7, n.313, 2016.

RADOSHEVICH, L.; COSSART, P. *Listeria monocytogenes*: towards a complete picture of its physiology and pathogenesis. **Nature reviews Microbiology**. V.16, p. 32–46, 2018.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. Molecular cloning: **A Laboratory Manual. Third Edition. New York**. Cold Spring Harbor Laboratory Press V1, Chapter 6, Protocol 7, 2001 com adaptações.

SAMUEL CAMPANELLI FREITAS COUTO. **Influência dos sistemas de quorum sensing AI-1/AI-2/AI-3 nos fatores de virulência de EPEC atípica de origem animal**. Universidade de São Paulo. São Paulo, 2018.

SARAOU, T.; FALL, P.A.; LEROI, F.; ANTIGNAC, J.F.; CHÉREAU, S.; PILET, M.F. Inhibition mechanism of *Listeria monocytogenes* by a

bioprotective bacteria *Lactococcus piscium* CNCM I-4031. **Food Microbiology**, v.53, p. 70-76, 2016.

SIAMANSOURI, M.; MOZAFFARI, S.; ALIKHANI, F. Bacteriocins and lactic acid bacteria. **J. Biol. Today's World**. v. 2, p. 227-234, 2013.

SOLA, M.C.; OLIVEIRA A.P.; FEISTEL, J.C.; REZENDE C.S.N. ENCICLOPÉDIA BIOSFERA, Centro Científico Conhecer - **Goiânia**, v.8, N.14; 2012.

SONG, A.A.L.; IN, L.L.A.; LIM, S.H.E.; RAHIM, R.A. A review on *Lactococcus lactis*: from food to factory. **Microb Cell Fact**, v.16, n.55, p. 1-15, 2017

SUGANTHI, V.; SELVARAJAN, E.; SUBATHRADEVI, C.; MOHANASRINIVASAN, V. Lantibiotic nisin: Natural preservative from *Lactococcus lactis*. **Int res J Pharma**, v.3, n.1, p. 13-19, 2012.

SUSKOVIC, J.; KOS, B.; BEGANOVIC, J.; PAVUNC, A.L.; HABJANIC, K.; MATOSIC, S. Antimicrobial Activity The most important property of probiotic and starter lactic acid bacteria. **Fd Technol Biotechnol**, v.48, n.3, p.296-307, 2010.

TAN, KH.; HOW, KY.; TAN, JY.; YIN, W.F.; CHAN, K.G. Cloning and characterization of the autoinducers synthase gene from lipid-degrading bacterium *Cedecea neteri*. **Front microbiol**, 8 (e48053): 72, 2017.

TRUONG, D.; COPELAND, J. W.; BRUMELL, J. H. Bacterial subversion of host cytoskeletal machinery: hijacking formins and the Arp2/3 complex. **Bioessays**, v.36, p.687-696, 2014.

VERA, A.; GONZÁLEZ, G.; DOMÍNGUEZ, M.; BELLO, H. Principales factores de virulência de *Listeria monocytogenes* y su regulación. **Rev Chilena Infectol**, v.30, n.4, p. 407-416, 2013.

XAYARATH, B.; ALONZO, F.; FREITAG, N. E. Identification of a Peptide-Pheromone that Enhances *Listeria monocytogenes* Escape from Host Cell Vacuoles. **PLoS Pathog**. v.11, n. 3, 2015.

WANG, Y.; SHANG, N.; QIN, Y.; ZHANG, Y.; ZHANG, J.; LI, P. The complete genome sequence of *Lacto-bacillus plantarum* LPL-1, a novel antibacterial probiotic producing class IIa bacteriocin. **Journal of Bio-technology**, v. 17, n.266, p. 84-88, 2018.

WEISE, G.M.; JESPERSEN, I. Transcriptional analysis of genes associated with stress and adhesion in *Lactobacillus acidophilus* NCFM during the passage through an in vitro gastrointestinal tract model. **Journal of molecular microbiology and biotechnology**. v.18 p. 206-214, 2010.

WORAPRAYOTE, W.; MALILA, Y.; SORAPUKDEE, S.; SWET-WIWATHANA, A. Bacteriocins from lactic acid bacteria and their applications in meat and meat products. **MESC**, n.120, p. 118–132, 2016.

YEUNG, V.P.; GIENI, R.S.; UMETSU, D.T.; DEKRUYFF, R.H. Heat-killed *Listeria monocytogenes* as an adjuvant converts established murine Th2-dominated immune responses into Th1-dominated responses. **Journal of immunology**. v.161, p.4146-4152, 1998.

ZIEMICHÓD A, SKOTARCZAK B. QS – systems communication of gram-positive bacterial cells. **Acta Biol**, v.24, p.51–56, 2017.

ADENDO

Adendo 1. Resultados incompletos – Pesquisa em andamento

Devido ao cenário mundial, causado pela pandemia de coronavírus (COVID-19 - Sars-Cov-2) a qual levou a interrupção de diversas atividades, dentre estas, das Instituições de Ensino Superior, incluindo a Universidade Federal de Pelotas (UFPEL), resultou na impossibilidade do trabalho presencial desde 03/2020 até o presente momento (03/2021). Neste sentido, o presente estudo foi prejudicado, e assim, parte da pesquisa de campo, como investigação do efeito de *L. monocytogenes* mediado pelo gene *luxS* por *quorum sensing* em *L. lactis* subsp. *Lactis* (R7) por qRT-PCR em tempo real e genotipagem, não foram executados no período proposto, pois estes experimentos necessitavam da utilização de outros laboratórios parceiros da UFPEL, o que não foi possível devido ao número reduzido de circulação de pessoas, acúmulo de pesquisas, sobrecarga das rotinas, entre outros.

Com a aprovação da aluna no Doutorado e de acordo com a orientação da Pró-Reitoria de Pós-Graduação desta Instituição, a defesa da Dissertação será realizada, porém, a confecção do diploma de Mestre ficará condicionada ao desenvolvimento pleno das pesquisas propostas neste estudo, com subsequente elaboração e submissão de um artigo científico à Revista Científica de alto impacto. Desta forma, os resultados não apresentados nesta etapa serão realizados/executados assim que possível, e inseridos neste documento.

6.4 Genotipagem

6.4.1 Extração de DNA

A extração de DNA foi realizada de acordo com o método de Sambrook (2001) onde inicialmente os micro-organismos foram cultivados em placas nas quais para *L. lactis* R7 foi utilizado o Agar MRS em anaerobiose e incubada por 37°C e para as cepas de *L. monocytogenes* o Agar Oxford, ambas incubadas a 37°C por 48 horas. Com um *swab* foi removido todo cultivo para *ependorf* contendo 1 mL de STES e centrifugados a 1300 × *g* 3 min. O sobrenadante foi descartado, em outro tubo o STES foi moderadamente aquecido e logo após o *pellet* ressuspenso em 100µL de STES e adicionadas as pérolas de vidro (0,1ul medido no *ependorf*). Após, foram adicionados 150 µL de fenol

clorofórmio 1:1 e agitados novórtexpor 1 min. Em seguida foram centrifugados a 13000 × g por 5 minutos e, posteriormente, coletado o sobrenadante em um novo microtubo etiquetado (anotando-se o volume coletado de 10 em 10 µL) e depois foi precipitado com etanol absoluto (multiplicando por 2 o volume do sobrenadante) e cloreto de sódio (5M) (multiplicando o volume do sobrenadante por 0,1). Na sequência, os microtubos foram estocados a -20°C por 1 hora. Após a estocagem os microtubos foram centrifugados por 20min a 13000 × g e, em seguida, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* lavado com 125 µL de álcool 70% sendo repetida esta lavagem cuidando para não remover *pellet*. Depois da lavagem os eppendorfs foram incubados invertidos a 37°C para secagem. E finalmente foram eluídos com 35 µL de água ultrapura (Milli-q) e adicionado 1 µL de RNase e depois DNA foi quantificado em gel de agarose a 1% e logo após armazenados a -80 C°.

6.4.2 Amplificação do DNA por PCR

O gene *luxS* foi amplificado utilizando oligonucleotídeos iniciadores descritos na Tabela 1. Foram preparadas reações contendo 16µL de mistura especial para PCR (GoTaq- Promega, Madison, WI USA), 1µl de cada oligonucleotídeo iniciador, 1µL de amostra e 1µL de água ultrapura (Milli-q), totalizando 20µL de volume final. Em um termociclador o gene de *luxS* foi amplificado utilizando o protocolo térmico apresentado na Tabela 2: desnaturação inicial (DI), ciclos 30 de desnaturação (D), anelamento (A) e extensão (E) e extensão final (EF). Os produtos amplificados pela PCR foram analisados em gel de agarose a 1% após eletroforese. A visualização dos fragmentos resultantes foi obtida em foto documentador com transluminação ultravioleta após coloração com *Sybr Safe* (Invitrogen®). A técnica de PCR foi realizada de acordo com protocolo padronizado no laboratório.

Tabela 2. Protocolos de tempo e de temperatura utilizados na identificação genotipagem.

Genes	DI	D	A	E	EF	Referências
<i>luxS</i>	5 min 95°C	45s 94°C	30s 55°C	30 s 72°C	10 min 72°C	ZHUN et al. (2008)
23S	5 min 95°C	30s 95°C	30s 55°C	30 s 72°C	7 min 72°C	DUBERNET et al. (2002)

7.4 Investigação do efeito de *L. monocytogenes* mediado pelo gene *luxSpor quorum sensing* em *L. lactis* subsp. *Lactis*(R7)

As mono-culturas de cada bactéria foram incubadas em caldo BHI a 37°C. Após 6 horas (fase de crescimento exponencial médio), alíquotas de 50 mL de cada cultura contendo $1,0-1,5 \times 10^8$ UFC mL⁻¹ foram centrifugadas a $3000 \times g$ por 10 min em tubos falcon (50 mL). Um dos tubos contendo a cultura de *L. lactis*R7 foi considerado controle.

Outros tubos contendo a cultura *L. lactis*R7 foram misturados com 50 mL de cultura de células de *L. monocytogenes* proveniente dos 50 mL centrifugados e a células de *L. monocytogenes* inativadas pelo calor.

Cinquenta (50) mL de cultura de *L. monocytogenes* cultivadas durante 6 horas a 37°C foram lavadas três vezes com tampão fosfato salina (PBS; pH 7,0) e inativadas pelo calor durante 1 hora a 80°C (YEUNGET et al., 1998; HANSENet al., 2000). Após a lavagem adicional, as células foram analisadas quanto à viabilidade por meio da contagem em agar BHI. Todas as culturas acima mencionadas foram misturadas e incubadas durante 4 horas a 37°C. Nos tempos(t) = 0, 2 e 4 horas as amostras foram coletadas para isolamento do RNA. Amostras isoladas no tempo (t) = 0 foram usadas como linha de base.

6.6 PCR em tempo real para a investigação do *quorum sensing*

6.6.1 Extração do RNA

As mono-culturas e a co-culturas tiveram o RNA extraído por meio da técnica descrita por SILVA (2015) na qual as células foram submetidas a extração de RNA total. Para isso, foram adicionadas a 1mL de TRIzol® *(ZymoResearch, EUA) e mantidas por 5 min a temperatura ambiente (TA), para ocorrer lise celular. Após este tempo, foram adicionados 200µL de clorofórmio em cada uma das amostras que foram agitadas manualmente por inversão. Após 3 min, em temperatura ambiente, cada uma das amostras foi centrifugada a $12.000 \times g$ por 15 min a 4°C.

Foram separadas três fases, sendo um sedimento branco (DNA), uma fase incolor (RNA) e uma rósea (proteínas). A fase incolor foi transferida para um microtubo (1,5 mL), no qual foram adicionados 500µL de isopropanol e mantido por 10 min a temperatura ambiente, para precipitação de RNA. Foi

feita nova centrifugação a $12.000\times g$ por 10 minutos a 4°C , o sobrenadante foi descartado e o sedimento lavado com $500\ \mu\text{L}$ de etanol absoluto (Synth®) diluído a 75% (v/v), seguido de centrifugação por mais 5 min a $10.500\times g$. Após todo o processo, o extrato contendo RNA foi adicionado de solução aquosa a 0,1% (v/v) de dietilpirocarbonato - DEPC (Sigma-Aldrich®, EUA) e mantido por 10 min a 60°C para facilitar sua dissolução. Logo após cada extração foi armazenada a -80°C .

6.6.2 Análise da pureza e integridade do RNA extraído

O grau de pureza de cada amostra de RNA total extraído das células de *L. monocytogenes* foi avaliado em espectrofotômetro pela leitura das absorbâncias nos comprimentos de onda de 260 nm e 280 nm. Valores de razão entre as leituras em 260 e 280 nm acima de 1,8 indicaram pureza adequada das amostras para utilização nos experimentos de quantificação da expressão gênica. Razões inferiores indicam a presença de proteínas, fenol ou outros contaminantes que absorvem fortemente em ou próximo a 280nm. Pela leitura no espectrofotômetro a 260 nm também foi possível quantificar o RNA presente nas amostras (ng/ μl) e os extratos foram posteriormente diluídos com água DEPC (Sigma-Aldrich®) para obter soluções contendo 40ng/ μl . Em seguida, o extrato contendo o RNA foi tratado, conforme instruções do fabricante, com o kit *DNase I RNase-free* (ThermoScientific®, Lituânia) para remoção de DNA contaminante.

Amostras contendo RNA também foram analisadas por eletroforese para verificação de sua integridade. Para isso, foi preparado gel de agarose (Axygen, EUA) 1,2% (p/v) em tampão Tris/Borato/EDTA – TBE (Invitrogen®) preparado com água DEPC (Sigma-Aldrich®). Como marcador de peso molecular na eletroforese (100 a 5000 pb) será utilizado 1 μl do *GeneRuler Express DNA Ladder* SM1551 (ThermoScientific, EUA). Uma alíquota de 2 μL de cada amostra contendo RNA foi misturada com 3 μl de água ultra purificada (MilliQ®, Millipore, EUA) e 5 μl de solução 0,07% (p/v) de azul de bromofenol (Bio-Agency®, Brasil). O volume total da solução assim preparada (10 μl) foi aplicado no gel de agarose. A eletroforese ocorreu com tampão TBE por 40 min, numa corrente elétrica 1,81A a 90V (PowerPac™, BioRad, EUA).

O gel de agarose foi corado com solução de brometo de etídeo (Synth®)

a 0,5 µl/mL e observado em transiluminador ultravioleta para foto documentação (MiniBis UV, DNR Bio-Imaging Systems, Israel).

A amostra foi considerada íntegra se estiverem presentes no gel de agarose duas bandas com pesos moleculares de aproximadamente 1000pb e 1500pb, correspondentes respectivamente às frações 16S e 23S do RNA ribossomal bacteriano.

6.6.3 Síntese de DNA complementar (cDNA)

As amostras de RNA foram diluídas para obter uma concentração de 100ng/µl e, em seguida, foi realizada a reação para a síntese de DNA complementar (cDNA), a partir do RNA extraído. Para isso, foram seguidas as instruções do kit *High-Capacityc DNA Reverse Transcription* contendo inibidor de RNase (n° 4374966, AppliedBiosystems, EUA). As amostras de cDNA foram mantidas a -20°C até a realização do ensaio de PCR em tempo real. O cDNA foi analisado por monoplex PCR em tempo real, para a quantificação da expressão dos genes relacionados ao QS (genes *luxS* e *23S rRNA*), conforme Tabela 1.

Tabela 1. Oligonucleotídeos utilizados na análise da expressão gênica por qRT-PCR.

Primers	Sequencias (5'-3')	Produto	Referencias
<i>luxS-f</i>	CTTGCCCCTTATGTCCGTTT	99pb	Jenabianet al. (2011)
<i>luxS-r</i>	GGCATTTCGCATTAGGTTGAA	99pb	Jenabianet al. (2011)
<i>23S rRNA-f</i>	TGTCAGGTGGGCAGTTTGAC	43pb	Jenabianet al. (2011)
<i>23S rRNA-f</i>	TTGAGCGCCTCCGTTACAC	43pb	Jenabianet al. (2011)
<i>16S-rRNA-f</i>	GATGCATAGCCGACCTGAGA	35pb	Silva (2015)
<i>16S-rRNA-r</i>	TGCTCCGTCAGACTTTTCGTC	35pb	Silva (2015)

6.6.4 PCR quantitativo de transcrição reversa (qRT-PCR)

A transcrição reversa utilizando o Reagente de Transcrição Reversa TaqMan foi conduzida como descrito por Moslehi-Jenabiane colaboradores (2009) onde a síntese do cDNA foi realizada utilizando o Reagente de Transcrição Reversa TaqMan num volume final de 100 µl; 1 µg de RNA foi transcrito reversamente com 5 µl de iniciadores hexâmeros aleatórios (50 µM), 20 µl de mistura de dNTP (10 mM, 2,5 mM cada dNTP) e 2,5 µl de

Transcriptase Reversa MultiScribe (50 U / μ l), 10 μ l 10 \times tampão de PCR, 22 μ l de solução de MgCl₂ (25 mM), 2 μ l de inibidor da RNase (20 U / μ l) e ajustado para 100 μ l utilizando água de graduação molecular. Para cada amostra, foi incluído um controle de transcriptase não reversa para confirmar a ausência de DNA contaminante. A síntese de cDNA foi realizada num GeneAmp PCR System 9700 com as seguintes condições cíclicas: 25°C durante 10 min (incubação), 48°C durante 30 min (transcrição reversa), 95°C durante 5 min (inativação de a enzima). O cDNA foi armazenado a -80°C. Um controle de transcriptase não reversa foi incluído para confirmar a ausência de DNA contaminante.

As amplificações por qRT-PCR foram realizadas com pelo menos três réplicas biológicas usando a Química Baseada em Sonda TaqMan em triplicata em um Sistema de PCR em Tempo Real 7500. O gene *housekeeping 23S rRNA* foi escolhido para normalizar as quantidades de RNA (controle interno) de acordo com Weiss e Jespersen (2010). A adequação do gene *housekeeping* foi verificada pelo isolamento do DNA genômico e do RNA durante os experimentos. A sequência que codifica para os genes *luxS* (NC_006814 LBA 1081) e *23S rRNA* (NC_006814 LBA_2002) de *L. lactis* R7 foi recuperada a partir das bases de dados GenBank EMBL. Os oligonucleotídeos iniciadores relacionados ao *quorum sensing* (Tabela 1) foram concebidos utilizando o software Primer Express v3.0. O cDNA diluído equivalente a 1 ng de material de partida de RNA foi utilizado como molde para a amplificação por qRT-PCR como descrito anteriormente (Jenabian et al., 2011). O nível transcricional de *luxS* foi normalizado para o nível transcricional do gene *23S rRNA*. As alterações relativas (x vezes) no nível de transcrição em amostras induzidas e de linha de base foram calculadas como descrito por Pfaffl (2001).

Os ensaios foram realizados considerando um limiar de detecção (“*threshold*”) de 0,014, sendo que os valores de Ct (“*cycle threshold*”) correspondem ao ciclo de amplificação em fase exponencial onde ocorre a intersecção com este limiar (GRADY et al., 2008).

Os valores de Ct foram utilizados para avaliar a expressão diferencial dos genes salvos nas diferentes condições e, para isso, foi calculado o $\Delta\Delta$ CT. Conforme descrito por Livak e Schmittgen (2001), a expressão gênica foi

calculada com a fórmula $QR=2^{-\Delta\Delta CT}$, onde QR representa o nível de expressão gênica, CT o ciclo de amplificação no qual cada amostra apresenta amplificação exponencial e ΔCT representa a diferença entre o CT do gene alvo de interesse amplificado e o CT do gene controle endógeno amplificado. O $\Delta\Delta CT$ representa a diferença entre o ΔCT da amostra teste e o ΔCT da amostra de referência - calibrador.

Para fazer a comparação das amostras, os valores de Ct obtidos foram normalizados e calibrados, conforme as fórmulas abaixo:

Normalização: $Ct_{(gene\ alvo)} - Ct_{(controle\ end\ ógeno)} = \Delta Ct$ - Calibração: $\Delta Ct_{(co-cultura)}$
- $\Delta Ct_{(mono-cultura)} = \Delta\Delta Ct$

Em seguida foram avaliados quanto ao nível de expressão gênica pela fórmula: QR (nível de expressão gênica) = $2^{-\Delta\Delta CT}$

Os valores da expressão gênica de cada amostra foram representados em unidades arbitrárias.