

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

**Avaliação do efeito inibitório e da expressão de genes associados à
resistência de *Listeria monocytogenes* exposta à nisina nas formas livre e
nanoencapsulada em lipossomos de fosfatidilcolina**

Dissertação de mestrado

Rafael Jose Pauliello

Porto Alegre, 03 de Maio de 2021

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

**Avaliação do efeito inibitório e da expressão de genes associados à
resistência de *Listeria monocytogenes* exposta à nisina nas formas livre e
nanoencapsulada em lipossomos de fosfatidilcolina**

Dissertação submetida ao Programa de
Pós Graduação em Biologia Celular e
Molecular do Centro de Biotecnologia da
UFRGS como requisito parcial para
obtenção do título de Mestre em Biologia
Celular e Molecular

Rafael Jose Pauliello

Orientador: Prof. Dr. Adriano Brandelli

Porto Alegre, 03 de Maio de 2021

CIP - Catalogação na Publicação

Pauliello, Rafael Jose

Avaliação do efeito inibitório e da expressão de genes associados à resistência de *Listeria monocytogenes* exposta à nisina nas formas livre e nanoencapsulada em lipossomos de fosfatidilcolina / Rafael Jose Pauliello. -- 2021.

272 f.

Orientador: Adriano Brandelli.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Centro de Biotecnologia do Estado do Rio Grande do Sul, Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Porto Alegre, BR-RS, 2021.

1. *Listeria monocytogenes*. 2. Nisina. 3. Lipossomos. 4. PCR em tempo real. 5. Regulação bacteriana da expressão gênica. I. Brandelli, Adriano, orient. II. Título.

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada do Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos da UFRGS e no Laboratório de Genomas e Populações de Plantas do Instituto de Biociências da UFRGS, com financiamento da Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES

Dedico este trabalho a Deus! Criador dos céus, da terra e de todas as coisas, visíveis e invisíveis (Colossenses 1:16), inclusive da minha própria existência! Quanto mais estudo, descubro que menos sei e quão grandiosa é a complexidade infindável e a perfeição da tua obra! Tu és o meu refúgio e a minha fortaleza para todos os momentos, rocha inabalável, o meu Deus, em quem deposito toda minha confiança (Salmos 91:2). Tu não escolhe os capacitados simplesmente porque os são, mas se necessário capacita aqueles que escolheu. “ ... Eu não te mandei? Esforça-te e tenha bom ânimo, não pases, nem te espantes, porque o Senhor, teu Deus, é contigo, por onde quer que andares ...” (Josué 1:9). Uma vez que tu és capaz de fazer infinitamente mais do que tudo o que eu possa pedir ou mesmo imaginar (Efésios 3.20), quero cada vez mais, viver os teus sonhos para minha vida, os quais são muito melhores que os meus e usá-la para fazer a tua obra e a tua vontade!

Agradecimentos

Agradeço a Deus antes de todos os demais, por encontrar em ti a ajuda necessária, sempre que os entraves se tornavam maiores que as minhas forças.

Agradeço aqueles que foram os formadores do meu caráter, meus orientadores para a vida, meus apoiadores incondicionais, meu pai (em memória), minha mãe e minha avó materna (em memória). Sem vocês, eu não teria uma trajetória para olhar e me orgulhar. Particularmente, agradeço ainda minha mãe por todo suporte oferecido para conclusão da redação da dissertação.

Agradeço a meu filho, que apesar da pouca idade soube compreender que o mestrado era algo importante pra mim, que haveriam impactos em sua rotina, mas que estes seriam temporários.

Agradeço a todos professores que tive ao longo da minha vida. Para chegar aqui, foi necessário o que aprendi com cada um de vocês. Porém, agradeço de maneira especial aos professores do PPGBCM e do PPGCF da UFRGS, prof. Dr. Arnaldo Zaha, profa. Dra. Carmem Regla Vargas, Prof. Dr. Giancarlo Pasquali, Prof. Dr. Henrique B. Ferreira, Prof. Dr. Helder Ferreira Teixeira, Prof. Dr. Hugo Verli, Profa. Dra. Karina M. Monteiro, Profa. Dra. Livia K. Rosa e Silva, Profa. Dra. Lucélia Santi, Profa. Dra. Marilene H. Vainstein e Prof. Dr. Rogerio Margis, os quais foram meus mestres durante o transcorrer do mestrado. Muito obrigado pelo conhecimento compartilhado, pelas experiências transmitidas, pelo tempo dedicado de vocês para que eu e outros pós-graduandos nos tornássemos profissionais melhores. O salário de vocês pode remunerar a jornada de trabalho, mas não remunera o fato de vocês mudarem o mundo através da educação e do resultado das pesquisas de vocês!

Agradeço a meu orientador, prof. Dr. Adriano Brandelli, pela liberdade em definir meus interesses de pesquisa, por sua orientação, por me apontar prioridades e pontos críticos ao longo do trabalho, pelos contatos que me indicou, por compreender as limitações associadas a minha rotina de vida e por confiar o

uso do laboratório em horários alternativos para realização dos experimentos. Você foi fundamental para o meu êxito!

Agradeço de igual maneira e intensidade ao prof. Dr. Rogerio Margis, pelo aprendizado, pelos contatos que me indicou, pela cooperação acadêmica no fornecimento de insumos e reagentes de PCR, por também confiar o uso do laboratório em horários alternativos para realização dos experimentos e pela confiança que eu conseguiria. Você também foi fundamental para o meu êxito!

Agradeço ao atual coordenador do PPGBCM, prof. Dr. Hugo Verli, pela sua compreensão e razoabilidade todas as vezes que necessitamos dialogar. Além de um professor e pesquisador de destaque, você é um ser humano incrível!

Agradeço a todos meus colegas do lab 218 pela convivência, em particular ao Cristian Mauricio Barreto Pinilla, pelo conhecimento de bancada, ao Henrique Ataide Issaia, pelo conhecimento de bancada, pelos debates técnico-científicos, pela ajuda na resolução de questões administrativas na ausência do prof. Adriano, à Maria Elisa Paillie Jimenez, pela ajuda na execução do ciclo de redução de tamanho dos lipossomos, quando eu precisei de quatro mãos para dar conta do trabalho, à pós-doc Ana Paula Folmer Correa, por tua ajuda com a eletroforese e teus contatos no departamento de genética e biologia molecular e ao pós-doc Flávio Fonseca Veras, pelas tuas cobranças com a organização do laboratório.

Agradeço ao prof. Dr. Caciano Pelayo Zapata Noreña do laboratório de Engenharia de Processos de Alimentos do ICTA por ceder a utilização do rotoevaporador e ao mestrando Loleny Tavares pelas orientações de uso relativas ao mesmo.

Agradeço à profa. Dra. Cristiane Pontes de Oliveira do lab. K-106 do Instituto de Química da UFRGS pelo tempo empenhado na orientação para realização das leituras no Zetasizer.

Agradeço aos colegas pós-graduandos do laboratório de Citogenética e Evolução Molecular do PPGBM, pela possibilidade de utilização do espectrofotômetro NanoDrop.

Agradeço aos pós-graduandos do Laboratório de Genomas e Populações de Plantas (LGPP) da UFRGS, Isabel Cristina Cadavid pela conversa sobre reagentes de PCR, Debora Zamban pelo aprendizado de bancada e Nureyev Ferreira Rodrigues pela orientação de uso do termociclador.

Agradeço à Odimara Fantin, pela frequente ajuda com a lavagem de vidrarias, o descongelamento e homogeneização de amostras e acima de tudo a companhia no laboratório.

Agradeço à doutoranda do PPGEST da UFRGS, Anny Kerollayny Gomes Rodrigues, pela ajuda na interpretação da modelagem estatística do algoritmo NormFinder.

Agradeço à secretária do PPGBCM, Sílvia Regina Centeno (Silvinha), ao Luciano e a todos os demais colaboradores da equipe, sempre dispostos a nos ajudar na resolução das mais diversas dificuldades acadêmicas. Você é outro ser humano incrível Silvinha!

Agradeço a todos servidores da UFRGS, a quem cuidava dos livros, a quem cuidava dos computadores, a quem fazia o trabalho administrativo, a quem preparava o almoço, a quem limpava a sala de aula, a quem retirava o lixo do laboratório, a quem passava às 21h00, às 00h00, às 03h00 em frente ao laboratório, batia na porta e fazia sinal pelo visor, perguntando se estava tudo sob controle, dentre outras atividades. Sem vocês, nada seria possível.

Por fim, agradeço de maneira especial ao prof. Dr Rogério Margis, Profa. Dra. Lucélia Santi e Profa. Dra. Karine Rigon Zimmer, pelo tempo dedicado à leitura deste trabalho e composição da banca examinadora. Fico honrado com a participação de vocês!

Reach a numerical result is easy.

Reach the correct result not so much!

(autor desconhecido)

Índice

Lista de abreviaturas, símbolos e unidades de medida	pág. 15
Lista de figuras e tabelas	pág. 18
Resumo	pág. 27
<i>Abstract</i>	pág. 29
1. Introdução	pág. 31
1.1 Listeriose	pág. 31
1.1.1 Agente causador	pág. 31
1.1.2 Patogênese e sintomatologia	pág. 32
1.1.3 Diagnóstico, tratamento, taxas de incidência e mortalidade	pág. 35
1.1.4 Principais fatores de virulência	pág. 41
1.2 Bacteriocinas	pág. 43
1.2.1 Definição	pág. 43
1.2.2 Classificação e mecanismos de ação	pág. 44
1.2.3 Lantibióticos	pág. 48
1.2.4 Biossíntese da nisina	pág. 50
1.2.5 Estrutura e propriedades da nisina	pág. 52
1.2.6 Desenvolvimento de resistência	pág. 55
1.3 Lipossomos	pág. 56
1.3.1 Definição	pág. 56
1.3.2 Classificação	pág. 57
1.3.3 Métodos de preparação	pág. 58
1.3.4 Principais vantagens na utilização	pág. 59
1.4 Genes associados à resistência à nisina	pág. 63
1.4.1 <i>virR</i>	pág. 63
1.4.2 <i>prfA</i>	pág. 71
1.4.3 <i>sigB</i>	pág. 75
1.4.4 <i>ctsR</i>	pág. 86
1.4.5 <i>sod</i> , <i>kat</i> e <i>lmo1433</i>	pág. 93
1.4.6 <i>recA</i> , <i>lexA</i> e <i>dnaA</i>	pág. 97

2. Objetivos	pág. 109
2.1 Objetivo geral	pág. 109
2.2 Objetivos específicos	pág. 109
3. Materiais e métodos	pág. 111
3.1 Preparo da formulação de nisina	pág. 111
3.2 Preparo dos lipossomos	pág. 111
3.3 Caracterização dos lipossomos	pág. 112
3.4 Produção das amostras	pág. 115
3.5 Extração do RNA	pág. 118
3.6 Projeto dos primers	pág. 119
3.7 Transcrição reversa	pág. 123
3.8 PCR quantitativo	pág. 124
3.8.1 Equipamentos, reagentes e protocolo utilizado	pág. 124
3.8.2 Uso de primers tagueados e a eliminação da degradação de mRNA e da contaminação com DNA genômico	pág. 129
3.8.3 Definição da <i>thresholdline</i> e a redução dos erros associados	pág. 130
3.8.4 Curvas de <i>melting</i> e a detecção de produtos de amplificação indesejados	pág. 132
3.8.5 Genes normalizadores	pág. 135
3.8.6 Determinação da eficiência de amplificação e a redução dos erros associados	pág. 136
3.8.7 Metodologia de cálculo para quantificação relativa e a redução dos erros associados	pág. 144
3.8.8 Número de replicatas biológicas e a melhora da relevância estatística	pág. 148
3.8.9 Teoria de propagação de erros e a determinação correta do erro experimental	pág. 149
4. Resultados	pág. 153
4.1 Preparo dos lipossomos	pág. 153
4.2 Caracterização dos lipossomos	pág. 154
4.3 Curvas de crescimento	pág. 156
4.4 Seleção dos genes e projeto dos primers	pág. 161

4.5 Experimentos secundários envolvendo as principais variáveis do qPCR	pág. 165
4.5.1 Uso de primers tagueados e a eliminação da degradação de mRNA e da contaminação com DNA genômico	pág. 165
4.5.2 Definição da <i>thresholdline</i> e a redução dos erros associados	pág. 167
4.5.3 Curvas de <i>melting</i> e a detecção de produtos de amplificação indesejados	pág. 175
4.5.4 Genes normalizadores	pág. 177
4.5.5 Determinação da eficiência de amplificação e a redução dos erros associados	pág. 180
4.5.6 Metodologia de cálculo para quantificação relativa e a redução dos erros associados	pág. 185
4.5.7 Teoria de propagação de erros e a determinação correta do erro experimental	pág. 185
4.6 Avaliação da expressão de genes associados à resistência à nisina	pág. 186
4.6.1 Estudo temporal da resposta	pág. 187
4.6.2 Estudo dose dependente	pág. 189
4.6.3 Expressão gênica diferencial	pág. 190
5. Discussão	pág. 194
5.1 Caracterização dos lipossomos	pág. 194
5.2 Avaliação do perfil inibitório	pág. 195
5.3 Experimentos secundários envolvendo as principais variáveis do qPCR	pág. 196
5.3.1 Uso de primers tagueados e a eliminação da degradação de mRNA e da contaminação com DNA genômico	pág. 196
5.3.2 Definição da <i>thresholdline</i> e a redução dos erros associados	pág. 198
5.3.3 Curvas de <i>melting</i> e a detecção de produtos de amplificação indesejados	pág. 200
5.3.4 Genes normalizadores	pág. 202
5.3.5 Determinação da eficiência de amplificação e a redução dos erros associados	pág. 204

5.3.6 Teoria de propagação de erros e a determinação correta do erro experimental	pág. 206
5.4 Avaliação da expressão de genes associados à resistência à nisina	pág. 207
5.4.1 Estudo temporal da resposta	pág. 207
5.4.2 Estudo dose dependente	pág. 211
5.4.3 Expressão gênica diferencial	pág. 213
6. Conclusões	pág. 218
7. Referências bibliográficas	pág. 221
Apêndice I – Mortalidade geral no Brasil, categoria A32 da CID-10 (listeriose), período 2007-2016	pág. 235
Apêndice II – Ferramentas para detecção e prevenção de produtos de amplificação indesejados	pág. 236
Apêndice III – Análise dos principais algoritmos de normalização	pág. 244
Apêndice IV – Utilização de curvas padrão para determinação da eficiência de amplificação	pág. 251
Apêndice V – Dedução das expressões para determinação do nível de expressão gênica relativa	pág. 253
Apêndice VI – Fotos do filme lipídico obtido e cultivos realizados nos ensaios de eficiência de encapsulação	pág. 256
Apêndice VII – Médias dos valores de Ct entre replicatas técnicas	pág. 258
Apêndice VIII – Rotina computacional elaborada para análise gráfica e regressão não linear sigmoidal	pág. 259
Apêndice IX – Eficiências de amplificação	pág. 265
Apêndice X – Fatores amostrais e fatores de normalização	pág. 267
Apêndice XI – Fatores amostrais normalizados	pág. 268
Apêndice XII – Níveis de expressão gênica – estudo temporal da resposta	pág. 269
Apêndice XIII – Médias e erros populacionais – estudo temporal da resposta ...	pág. 269
Apêndice XIV – Médias dos fatores amostrais normalizados	pág. 270
Apêndice XV – Médias e erros populacionais – estudo dose dependente	pág. 270

Apêndice XVI – Médias e erros populacionais – expressão gênica diferencial
..... pág. 271

Apêndice XVII – Médias e erros populacionais – análise complementar .. pág. 272

Lista de abreviaturas, símbolos e unidades de medida

APD – *Antimicrobial Peptide Database*

ATP – Adenosina trifosfato

ATR – Resposta de tolerância ao ácido (*acid tolerance response*)

BER – Reparo por excisão de base (*base excision repair*)

BHI – Infusão cérebro-corção (*brain heart infusion*)

BP – Tampão fosfato (*buffer phosphate*)

CAMPs – Peptídeo antimicrobiano catiônico (*cationic antimicrobial peptide*)

Cap. – Capítulo

CAPES – Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

CAT – Catalase

CDC – Centro de Controle e Prevenção de Doenças (*Centers for Disease Control and Prevention*)

cDNA – DNA complementar

DEPC – Dietil pirocarbonato

DLS – Espalhamento de luz dinâmica (*dynamic light scattering*)

DNA – Ácido desoxirribonucleico (*deoxyribonucleic acid*)

DNF-RT-qPCR – PCR quantitativo com transcrição reversa utilizando metodologia de primers taguados, livre de DNase (*DNase Free*)

dNTPs – Desoxirribonucleotídeos fosfatados

DSB – Quebra de fita dupla (*double strand breaks*)

DTA – Doença transmitida por alimentos

EROs – Espécies reativas de oxigênio

FDA – *Food and Drug Administration*

FRET – Transferência de energia por ressonância de fluorescência (*fluorescence resonance energy transfer*)

gDNA – DNA genômico

GI – Gastro intestinal (trato ou mucosa)

GPx – Glutational peroxidase

GRAS – Certificação geralmente reconhecido como seguro (*generally recognized as safe*)

GUS repórter gene – β -glicuronidase gene repórter

HIV – Vírus da imunodeficiência humana (*human immunodeficiency vírus*)

ICTA – Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos

IPD – Índice de polidispersão

LABs – Bactérias ácido lácticas (*lactic acid bacteria*)

LCR – Líquido céfalo-raquidiano

LGPP – Laboratório de Genomas e Populações de Plantas

LLO – Listeriolisina O

LRR – Domínio repetido rico em leucina (*leucine rich repeat*)

LTA – Ácido lipoteicoico (*lipoteichoic acid*)

LUVs - Vesículas unilamelares grandes (*large unilamellar vesicles*)

Man-PTS – Manose-fosfotransferase

MIC – Concentração inibitória mínima (*minimal inhibitory concentration*)

MLVs - Vesículas multilamelares (*multilamellar vesicles*)

MMC – Mitomicina C

M-MLV – Vírus da leucemia murina moloney (*moloney murine leukemia vírus*)

MMR – Reparo de malpareamento (*mismatch repair*)

MprF – Fator de resistência a múltiplos peptídeos (*multiple peptide resistance factor*)

mRNA – RNA mensageiro

MVVs - Vesículas multivesiculares (*multivesicular vesicles*)

NCBI – *National Center for Biotechnology Information*

NER – Reparo por excisão de nucleotídeo (*nucleotide excision repair*)

NHEJ – Junção de extremidades não-homólogas (*non-homologous end-joining*)

NIST – *National Institute of Standards and Technology*

O.D. – Densidade óptica (*optical density*)

PALS – Espalhamento de luz com análise de fases (*phase analysis light scattering*)

PCR – Reação em cadeia de polimerase (*polymerase chain reaction*)

pH – Potencial hidrogeniônico ou índice de acidez

PPGBCM – Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular
PPGBM – Programa de Pós Graduação em Genética e Biologia Celular
PPGCF – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas
PPGEST – Programa de Pós-Graduação em Estatística
PrfA – Fator regulatório positivo A (*positive regulatory factor A*)
qPCR – PCR quantitativo ou PCR em tempo real
RASFF – *Rapid Alert System for Food and Feed*
RecA – Proteína recombinase A
RefSeq – Banco de dados sequência de referência (*reference sequence*)
RNA – Ácido ribonucléico (*ribonucleic acid*)
RT-qPCR – PCR quantitativo com transcrição reversa (*reverse transcription*)
utilizando metodologia de primers convencionais
SigB – Fator sigma B
SNPs – Polimorfismo de nucleotídeo único (*single nucleotide polymorphism*)
SOD – Superóxido dismutase
ssDNA – DNA fita simples (*single strand DNA*)
STRs – Repetições curtas em tandem (*short tandem repeats*)
SUVs - Vesículas unilamelares pequenas (*small unilamellar vesicles*)
TA – Ácido teicóico (*teichoic acid*)
Taq DNA polimerase – DNA polimerase originada da bactéria *Thermus aquaticus*
T_m – Temperatura de *melting*
TSA – Teste de susceptibilidade a antimicrobianos
TSB – Caldo de triptona de soja (*tryptic soy broth*)
TSBY – Meio TSB suplementado com extrato de levedura
UFC – Unidades formadoras de colônia
UFRGS – Universidade Federal do Rio Grande do Sul
ULVs - Vesículas unilamelares (*unilamellar vesicles*)
UTR – Região não-codificante (*untranslated region*)
VBA – *Visual basic for applications*
virR – Gene virulence regulator
WT – Tipo selvagem (*Wild Type*)

Lista de figuras e tabelas

Figura 1 – Representação do ciclo de vida intracelular	pág. 33
Figura 2 – Número de casos anuais de listeriose por unidade da federação, reportados nos EUA ao CDC no ano de 2014	pág. 38
Figura 3 – Número de casos anuais de listeriose invasiva não associada à gravidez, reportados nos EUA ao CDC no ano de 2014, segregados por faixa etária e gênero	pág. 39
Figura 4 – Representação dos principais fatores de virulência sobre o ciclo de vida intracelular	pág. 43
Figura 5 – Mecanismo de ação das bacteriocinas e bacteriolisinas	pág. 48
Figura 6 – Representação das modificações pós-traducionais na síntese da nisina, em nível de peptídeo	pág. 49
Figura 7 – Representação das modificações pós-traducionais na síntese da nisina, em nível molecular	pág. 50
Figura 8 – Representação da biossíntese da nisina	pág. 51
Figura 9 – Sequência de peptídeos da molécula de nisina A	pág. 52
Figura 10 – Principais variantes da nisina	pág. 53
Figura 11 – Representação tridimensional da bicamada lipídica e lipossomo e corte transversal de um lipossomo	pág. 57
Figura 12 – Representação esquemática dos tipos de lipossomos	pág. 57
Figura 13 – Modelo de resistência aos CAMPs	pág. 66
Figura 14 – Síntese do raiocínio construído	pág. 68
Figura 15 – Níveis de atividade do GUS gene reporter acoplado ao promotor do operon <i>dlt</i>	pág. 69
Figura 16 – Nível de expressão relativa do gene <i>dltD</i> , sob diferentes concentrações de nisina, utilizando a linhagem 10403S de <i>Listeria monocytogenes</i>	pág. 70
Figura 17 – Representação do regulon <i>prfA</i>	pág. 72
Figura 18 – Viabilidade após exposição de <i>Listeria monocytogenes</i> ATR+ (preto) e ATR- (branco) ao ácido láctico	pág. 76

Figura 19 – Viabilidade após exposição de <i>Listeria monocytogenes</i> ATR+ (preto) e ATR- (branco) ao ácido clorídrico	pág. 77
Figura 20 – Viabilidade após exposição de <i>Listeria monocytogenes</i> WT(preto) e $\Delta sigB$ (branco) ao pH 2,5	pág. 78
Figura 21 – Redução de viabilidade após exposição de <i>Listeria monocytogenes</i> ao pH 2,5	pág. 78
Figura 22 – Viabilidade após co-cultivo de <i>Listeria monocytogenes</i> ATR+ (preto) e ATR- (branco) com <i>Lactococcus lactis</i> produtores de nisina	pág. 79
Figura 23 – % de sobrevivência após exposição de <i>Listeria monocytogenes</i> ATR+ (preto) e ATR- (branco) à nisina	pág. 80
Figura 24 – Viabilidade após cultivo de <i>Listeria monocytogenes</i> em meio com nisina. WT (preto) e $\Delta sigB$ (branco)	pág. 81
Figura 25 – Síntese do ratiocínio construído	pág. 82
Figura 26 – Composição de ácidos graxos saturados na membrana celular de <i>Listeria monocytogenes</i> ATR+ (preto) e ATR- (branco)	pág. 82
Figura 27 – Curvas de crescimento das cepas WT (losangos) e $\Delta ctsR$ (quadrados) de <i>Listeria monocytogenes</i> em meio sintético F70, com 2% NaCl a 37°C	pág. 87
Figura 28 – Curvas de crescimento das cepas WT (círculos cheios), $\Delta telA$ (círculos vazios) e $\Delta telA::telA$ (triângulos cheios) de <i>Listeria monocytogenes</i> em meio TSB-YE com 100 a 500 $\mu\text{g/ml}$ de Nisaplin (2,5% de nisina)	pág. 91
Figura 29 – Síntese do ratiocínio construído	pág. 93
Figura 30 – Reações associadas ao sistema GPx/GRd	pág. 95
Figura 31 – Síntese das reações apresentadas	pág. 96
Figura 32 – Viabilidade em meio BHI, contendo 1 mg/L de MMC, para as linhagens WT (branco) e $\Delta recA$ (preto)	pág. 102
Figura 33 – Viabilidade em meio BHI, das linhagens WT e $\Delta recA$, após exposição à rifampicina (cinza escuro) e estreptomicina (cinza claro)	pág. 103
Figura 34 – Viabilidade em meio BHI, sob ação de diferentes agentes estressores, para as linhagens WT (cinza escuro) e $\Delta recA$ (cinza claro)	pág. 104
Figura 35 – Distribuição de tamanho das cepas WT e $\Delta yneA$, antes e após o tratamento por 1 h com MMC	pág. 105

Figura 36 – Diâmetro médio das cepas WT (círculos), $\Delta yneA$ (quadrados), $\Delta recA$ (triângulos) e $\Delta recA\Delta yneA$ (losangos), antes (figuras vazadas) e depois (figuras cheias) do tratamento com MMC	pág. 106
Figura 37 – Síntese do raciocínio construído	pág. 108
Figura 38 – Código utilizado para identificação de amostras	pág. 118
Figura 39 – Esquema comparativo entre RT-qPCR e DNF-RT-qPCR	pág. 122
Figura 40 – Diagrama da programação completa utilizada no termociclador	pág. 125
Figura 41 – Comportamento do corante SybrGreen durante o ciclo de amplificação do qPCR. Amplicon disponível no início do ciclo (A), desnaturação (B), anelamento (C), extensão (D) e amplicons produzidos ao término do ciclo (E)	pág. 126
Figura 42 – Fases integrantes da curva de amplificação	pág. 131
Figura 43 – Aspecto característicos das curvas de <i>melting</i> nos formatos FxT (esquerda) e $-dF/dT \times T$ (direita)	pág. 133
Figura 44 – Quadro comparativo entre as expressões para cálculo da eficiência de amplificação	pág. 138
Figura 45 – Fluxograma de um método alternativo para cálculo da eficiência de amplificação, sem a utilização de uma curva padrão	pág. 139
Figura 46 – Comportamento da eficiência de amplificação em decorrência da saturação e ruído de fundo da técnica	pág. 144
Figura 47 – Tubos Duran com tampão fosfato (esquerda), lipossomos brancos imediatamente após o ciclo homogeneizador (centro) e imediatamente após o ciclo de redução de tamanho (direita)	pág. 153
Figura 48 – Curva de crescimento de <i>Listeria monocytogenes</i> sem adição de nisina	pág. 156
Figura 49 – Correlação entre as leituras obtidas por espectrofotometria e por contagem de UFC para o cultivo de <i>Listeria monocytogenes</i> sem adição de nisina	pág. 157
Figura 50 – Curvas de crescimento de <i>Listeria monocytogenes</i> com adição de nisina livre	pág. 158

Figura 51 – Funções obtidas por regressão para as curvas de crescimento de <i>Listeria monocytogenes</i> com adição de nisina livre	pág. 159
Figura 52 – Sobreposição das curvas de crescimento de <i>Listeria monocytogenes</i> sem e com adição de nisina livre, expressas em densidade óptica	pág. 159
Figura 53 – Sobreposição das curvas de crescimento de <i>Listeria monocytogenes</i> sem e com adição de nisina livre, expressas em UFC/mL	pág. 160
Figura 54 – Sobreposição das curvas de crescimento de <i>Listeria monocytogenes</i> para todas as condições experimentais, expressas em UFC/mL	pág. 161
Figura 55 – Variação da razão entre os valores médios de Ct	pág. 166
Figura 56 – Resultados do qPCR comparando o uso de primers taguados e convencionais para a amostra 21X5	pág. 166
Figura 57 – Resultados do qPCR comparando o uso de primers taguados e convencionais para a amostra 22X5	pág. 167
Figura 58 – Resultados do qPCR comparando o uso de primers taguados e convencionais para a amostra 23X5	pág. 167
Figura 59 – Resultados obtidos para o gene <i>sod</i> na amostra 22X3	pág. 168
Figura 60 – Resultados obtidos para o gene <i>recA</i> na amostra 22X3	pág. 169
Figura 61 – Resultados obtidos para o gene <i>sod</i> na amostra 21X3	pág. 170
Figura 62 – Exemplo de valores de <i>threshold</i> para o gene <i>dnaA</i> , condição experimental nisina livre concentração de 100 mg/L, definidos automaticamente pelo software (acima) e após análise das curvas de amplificação (abaixo)	pág. 173
Figura 63 – Comparação entre valores de Ct extraídos para o gene <i>ctsR</i> , condição experimental nisina nanoencapsulada, amostra 43X4, utilizando valor de <i>threshold</i> definido automaticamente pelo software (acima) e definido a partir da análise das curvas de amplificação (abaixo)	pág. 174
Figura 64 – Exemplo de curva de amplificação discordante das demais replicatas técnicas, obtida para o gene <i>prfA</i> , condição experimental lipossomo branco, replicata 3343	pág. 175
Figura 65 – Classificação adotada para as curvas de <i>melting</i>	pág. 176

Figura 66 – Predição da formação de dímeros de primers e autodobrementos para os primers <i>forward</i> , <i>reverse</i> tagueado e <i>reverse</i> all do gene <i>recA</i> , realizada através do programa AUTODIMER	pág. 177
Figura 67 – Estabilidade média dos genes controle remanescentes após análises sucessivas do algoritmo GeNorm	pág. 179
Figura 68 – Comportamento de uma função sigmoidal da família utilizada	pág. 181
Figura 69 – Exemplo do ajuste realizado através da função sigmoidal	pág. 182
Figura 70 – Classificação adotada para as curvas de eficiência	pág. 182
Figura 71 – Exemplo de curvas de eficiência de replicatas técnicas de uma mesma amostra	pág. 183
Figura 72 – Exemplo de curvas de eficiência de replicatas de amostras distintas, para uma mesma condição experimental e cDNA alvo	pág. 184
Figura 73 – Níveis de expressão gênica relativa ao longo do tempo – nisina livre 100 mg/L – genes reguladores	pág. 187
Figura 74 – Níveis de expressão gênica relativa ao longo do tempo – nisina livre 100 mg/L – genes associados ao estresse oxidativo e reparo de DNA	pág. 188
Figura 75 – Níveis de expressão gênica relativa ao longo do tempo – nisina livre 100 mg/L – genes constitutivos	pág. 188
Figura 76 – Níveis de expressão gênica relativa ao longo do tempo – nisina livre 100 mg/L – genes normalizadores	pág. 189
Figura 77 – Níveis de expressão gênica relativa – nisina livre 100 mg/L comparativamente à nisina livre 1 mg/L, no <i>time-point</i> 60 min pós adição	pág. 190
Figura 78 – Níveis de expressão gênica relativa – nisina nanoencapsulada comparativamente à nisina livre 100 mg/L, no <i>time-point</i> 60 min pós adição	pág. 191
Figura 79 – Níveis de expressão gênica relativa – lipossomo branco comparativamente à nisina livre 100 mg/L, no <i>time-point</i> 60 min pós adição	pág. 192

Figura 80 – Níveis de expressão gênica relativa – lipossomo branco comparativamente à nisina livre 1 mg/L, no <i>time-point</i> 60 min pós adição	pág. 193
Figura A-2.1 – Exemplo de resultados indicando a formação de dímeros de primers ou autodobramentos	pág. 238
Figura A-2.2 – Tela com dados de saída típicos do PRIMER 3 PLUS	pág. 240
Figura A-2.3 – Representação do algoritmo de sobreposição incremental na análise de dímeros de primers (esquerda) e autodobramentos (direita) ...	pág. 242
Figura A-2.4 – Tela com dados de saída típicos do AUTODIMER	pág. 242
Figura A-3.1 – Aumento da estabilidade do gene candidato a regulador a cada ciclo de exclusão realizado	pág. 246
Figura A-4.1 – Exemplo de curva padrão da reação de qPCR	pág. 251
Figura A-6.1 – Aspecto do filme lipídico obtido	pág. 256
Figura A-6.2 – Aspecto da placa Ni-03 após 24 h de cultivo em estufa a 37 °C .	pág. 256
Figura A-6.3 – Aspecto da placa Ni-03 após 48 h de cultivo em estufa a 37 °C .	pág. 257
Figura A-6.4 – Aspecto da placa Ni-03 após 72 h de cultivo em estufa a 37 °C .	pág. 257
Tabela 1 – Número de casos anuais de listeriose reportados nos EUA ao CDC e estados da federação envolvidos, entre os anos de 2010 e 2014	pág. 37
Tabela 2 – Prevalência de sorotipos dos casos anuais de listeriose invasiva reportados nos EUA ao CDC no ano de 2014	pág. 39
Tabela 3 – Principais diferenças entre bacteriocinas e antibióticos	pág. 44
Tabela 4 – Classificação originalmente proposta para as bacteriocinas	pág. 45
Tabela 5 – Classificação atualizada das bacteriocinas	pág. 47
Tabela 6 – Nomes e respectivas funções do genes integrantes do regulon <i>virR</i> .	pág. 64
Tabela 7 – Genes integrantes do regulon <i>sigB</i> , com possível contribuição à tolerância a agentes antimicrobianos	pág. 84
Tabela 8 – Genes integrantes do regulon <i>sigB</i> , coregulados por <i>prfA</i>	pág. 85

Tabela 9 – Exemplos de genes que foram superexpressos no experimento	pág. 89
Tabela 10 – Exemplo de gene que foi subexpresso no experimento	pág. 90
Tabela 11 – Resultados dos TSAs que revelaram maior susceptibilidade da cepa $\Delta te/A$, comparativamente à cepa WT	pág. 92
Tabela 12 – Concentrações inibitórias mínimas que revelaram maior susceptibilidade da cepa $\Delta te/A$, comparativamente à cepa WT	pág. 92
Tabela 13 – Nomes e respectivas funções do genes integrantes do regulon da resposta SOS.....	pág. 101
Tabela 14 – Classificação das populações de partículas conforme valores do índice de polidispersão	pág. 113
Tabela 15 – Composição de reagentes (amostra e mix de PCR) utilizados em um poço de reação	pág. 128
Tabela 16 – Quadro resumo das expressões disponíveis para determinação da expressão gênica relativa através do qPCR	pág. 148
Tabela 17 – Resultados obtidos através do equipamento Zetasizer nano S90. Da esquerda para a direita são apresentados o diâmetro médio e respectivo índice de polidispersão, os três diâmetros mais freqüentes na solução, em ordem decrescente e as respectivas freqüências associadas a cada diâmetro ...	pág. 154
Tabela 18 – Distribuição dos lotes de lipossomos entre as aplicações e replicatas biológicas	pág. 155
Tabela 19 – Potenciais Zeta obtidos através do equipamento Zetasizer nano Z, para os lotes de lipossomos branco (esquerda) e de nisina (direita)	pág. 155
Tabela 20 – Concentrações bacterianas nos cultivos de <i>Listeria monocytogenes</i> com adição de lipossomo de nisina e adição de lipossomo branco	pág. 160
Tabela 21 – Informações relativas aos genes selecionados	pág. 163
Tabela 22 – Relação dos primers projetados e utilizados no presente trabalho	pág. 164
Tabela 23 – Comparação entre as concentrações de RNA total obtidas por espectrofotometria NanoDrop	pág. 165
Tabela 24 – Valores de Ct obtidos após transcrição reversa das alíquotas	pág. 165

Tabela 25 – Resultados do qPCR para replicatas 2XX3, utilizando diferentes valores de <i>threshold</i>	pág. 171
Tabela 26 – Valores de <i>threshold</i> automaticamente definidos pelo software do termociclador e utilizados no presente estudo, para as condições experimentais nisina livre (NL), lipossomo branco (LB) e lipossomo de nisina (LN)	pág. 172
Tabela 27 – Valores de <i>threshold</i> definidos com base na análise das curvas de amplificação, para as condições experimentais nisina livre (NL), lipossomo branco (LB) e lipossomo de nisina (LN)	pág. 172
Tabela 28 – Estatística das classificação das curvas de <i>melting</i>	pág. 175
Tabela 29 – Scores máximos obtidos através do programa AUTODIMER para os primers dos genes <i>sod</i> , <i>sigB</i> e <i>recA</i>	pág. 177
Tabela 30 – Classificação dos genes em ordem decrescente de estabilidade. Observa-se que os genes <i>rpsL</i> e <i>rpoD</i> são apontados por dois dos algoritmos como os genes mais estáveis	pág. 178
Tabela 31 – Diferenças máximas e mínimas encontradas pela utilização de outros normalizadores ao invés do fator de normalização correto	pág. 180
Tabela 32 – Eficiências obtidas através da utilização das diversas expressões apresentadas no capítulo 3.8.6	pág. 180
Tabela 33 – Valores obtidos para cada metodologia de cálculo do erro ...	pág. 185
Tabela 34 – Razões entre os erros obtidos e suas respectivas médias populacionais	pág. 185
Tabela 35 – Comparação entre as expressões diferenciais obtidas para os genes <i>prfA</i> , <i>ctsR</i> , <i>dnaA</i> , <i>virR</i> , <i>kat</i> e <i>Imo1433</i>	pág. 216
Tabela A-1.1 – Óbitos por listeriose no Brasil 2007-2016	pág. 235
Tabela A-2.1 – Interpretação conjunta dos resultados do amplification plot, curva de <i>melting</i> e eletroforese em gel, para detecção de amplificação de produtos indesejados	pág. 237
Tabela A-3.1 – Comparação dos resultados obtidos pelos algoritmos	pág. 248
Tabela A-7.1 – Médias dos valores de Ct entre replicatas técnicas	pág. 258
Tabela A-9.1 – Eficiências de amplificação	pág. 265
Tabela A-10.1 – Fatores amostrais e fatores de normalização	pág. 267
Tabela A-11.1 – Fatores amostrais normalizados	pág. 268

Tabela A-12.1 – Níveis de expressão gênica – estudo temporal da resposta	pág. 269
Tabela A-13.1 – Médias populacionais – estudo temporal da resposta	pág. 269
Tabela A-13.2 – Erros populacionais – estudo temporal da resposta	pág. 269
Tabela A-14.1 – Médias dos fatores amostrais normalizados	pág. 270
Tabela A-15.1 – Médias populacionais – estudo dose dependente	pág. 270
Tabela A-15.2 – Erros populacionais – estudo dose dependente	pág. 270
Tabela A-16.1 – Médias populacionais – expressão gênica diferencial – condição experimental lipossomo branco, como situação questionada e nisina livre na concentração de 100 mg/L, como situação calibradora	pág. 271
Tabela A-16.2 – Erros populacionais – expressão gênica diferencial – condição experimental lipossomo branco, como situação questionada e nisina livre na concentração de 100 mg/L, como situação calibradora	pág. 271
Tabela A-16.3 – Médias populacionais – expressão gênica diferencial – condição experimental nisina nanoencapsulada, como situação questionada e nisina livre na concentração de 100 mg/L, como situação calibradora	pág. 271
Tabela A-16.4 – Erros populacionais – expressão gênica diferencial – condição experimental nisina nanoencapsulada, como situação questionada e nisina livre na concentração de 100 mg/L, como situação calibradora	pág. 271
Tabela A-17.1 – Médias populacionais – análise complementar – condição experimental lipossomo branco, como situação questionada e nisina livre na concentração 1 mg/L, como situação calibradora	pág. 272
Tabela A-17.2 – Erros populacionais – análise complementar – condição experimental lipossomo branco, como situação questionada e nisina livre na concentração 1 mg/L, como situação calibradora	pág. 272

Resumo

A listeriose, causada pela bactéria *Listeria monocytogenes*, constitui uma importante doença transmitida por alimentos (DTA), podendo causar hepatite subclínica em indivíduos hígidos, aborto em gestantes e meningite, encefalite, rombencefalite e óbito em indivíduos imunodebilitados ou imunodeficientes. Segundo o Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC), o número de casos anuais de listeriose invasiva nos EUA é em torno de 1.600 ocorrências, com uma taxa de mortalidade de 16,2% e segundo o *Rapid Alert System for Food and Feed* (RASFF), na união europeia, cerca de 2.500 ocorrências anuais, também com uma taxa de mortalidade de 16,2%. Nisina é um peptídeo antimicrobiano catiônico (CAMP) autorizado pelo *Food and Drug Administration* (FDA) para uso como conservante alimentar, bastante eficaz contra *L. monocytogenes*. O presente trabalho tem como objetivo avaliar o efeito inibitório (OD/UFC) e a expressão de genes associados à resistência (RT-qPCR) de *L. monocytogenes* exposta à nisina nas formas livre e nanoencapsulada em lipossomos de fosfatidilcolina do tipo vesículas unilamelares grandes (LUVs). Para isso, foram produzidas amostras contemplando 4 condições experimentais distintas: A ausência de nisina, nisina livre (100 mg/L e 1 mg/L), lipossomo branco e nisina nanoencapsulada. Foi demonstrada a ocorrência de forte redução do efeito inibitório da nisina nanoencapsulada comparativamente à nisina livre, inclusive com aumento da taxa de crescimento acima do cultivo sem nisina, sugerindo que possivelmente a fosfatidilcolina esteja promovendo o enriquecimento do meio de cultivo. Tanto a resposta temporal como o estudo dose dependente, demonstraram um forte aumento na expressão dos genes *sigB* e *ctsR* (361% e 319% na resposta temporal e 512% e 576% no estudo dose dependente, respectivamente) e uma forte redução na expressão dos genes *virR*, *kat* e *Imo1433* (57%, 89% e 91% na resposta temporal e 59%, 87% e 81% no estudo dose dependente, respectivamente), sugerindo que nos cultivos com nisina livre a modulação da resistência à nisina possivelmente seja realizada através de *sigB* e sugerindo que as defesas contra o estresse oxidativo possivelmente não tenham muita contribuição para a resistência à nisina. Com

relação à expressão gênica diferencial entre nisina nanoencapsulada e nisina livre 100 mg/L, foi demonstrado um aumento extremamente forte na expressão de *ctsR*, *dnaA* e *virR* (2.004%, 1.500% e 4.764%, respectivamente), um aumento muito forte na expressão de *prfA* e *lmo1433* (583% e 234%, respectivamente) e uma redução muito forte na expressão de *kat* (32%), sugerindo que nos cultivos com a sinalização da fosfatidilcolina, a modulação da resistência à nisina possivelmente seja realizada, além de *sigB*, através do aumento na expressão de *virR*, sugerindo que possivelmente o microrganismo esteja interpretando erroneamente estar no hospedeiro, aumentando a expressão dos fatores de virulência através do regulador *prfA* e corroborando que possivelmente a fosfatidilcolina esteja promovendo o enriquecimento do meio de cultivo.

Palavras-chave: *Listeria monocytogenes*; Nisina; Lipossomos; PCR em tempo real; Eficiência de amplificação; Expressão gênica; Regulação bacteriana da expressão gênica.

Abstract

Listeriosis, caused by the bacterium *Listeria monocytogenes*, is an important foodborne disease (FBD), which can cause subclinical hepatitis in healthy individuals, abortion in pregnant women and meningitis, encephalitis, rhombencephalitis and death in immunodeficient or immunodeficient individuals. According to the Center for Disease Control and Prevention (CDC), the number of annual cases of invasive listeriosis in the USA is around 1,600 occurrences, with a mortality rate of 16.2% and according to the Rapid Alert System for Food and Feed (RASFF), in the European Union, about 2,500 annual occurrences, also with a mortality rate of 16.2%. Nisin is a cationic antimicrobial peptide (CAMP) authorized by the Food and Drug Administration (FDA) for use as a food preservative, quite effective against *L. monocytogenes*. The present work aims to evaluate the inhibitory effect (OD/UFC) and expression of resistance-associated genes (RT-qPCR) of *L. monocytogenes* exposed to nisin in free and nanoencapsulated in large unilamellar vesicle-type (LUV) phosphatidylcholine liposomes forms. For that, samples were produced contemplating 4 different experimental conditions: The absence of nisin, free nisin (100 mg/L and 1 mg/L), white liposome and nanoencapsulated nisin. A strong reduction in the inhibitory effect of nanoencapsulated nisin has been demonstrated compared to free nisin, including an increase in the growth rate above the culture without nisin, suggesting that possibly the phosphatidylcholine is promoting the enrichment of the culture medium. Both the temporal response and the dose dependent study demonstrated a strong increase in the expression of the *sigB* and *ctsR* genes (361% and 319% in the temporal response and 512% and 576% in the dose dependent study, respectively) and a strong reduction in the expression of *virR*, *kat* and *Imo1433* genes (57%, 89% and 91% in the temporal response and 59%, 87% and 81% in the dose dependent study, respectively), suggesting that in the cultivation with free nisin the modulation of nisin resistance is possibly performed through *sigB* and suggesting that defenses against oxidative stress may not have much contribution to nisin resistance. Regarding the differential gene expression between nanoencapsulated nisin and free nisin 100 mg/L, a extremely strong increase in

the expression of *ctsR*, *dnaA* and *virR* (2,004%, 1,500% and 4,764%, respectively), a very strong increase in the expression of *prfA* and *Imo1433* (583% and 234%, respectively) and a very strong reduction in expression of *kat* (32%), suggesting that in cultures with phosphatidylcholine signaling, the modulation of nisin resistance is possibly performed, in addition to *sigB*, by increasing the expression of *virR*, suggesting that possibly the microorganism is misinterpreting being in the host, increasing the expression of virulence factors through the *prfA* regulator and corroborating that possibly phosphatidylcholine is promoting the enrichment of the culture medium.

Key-words: *Listeria monocytogenes*; Nisin; Liposomes; Real time PCR; Amplification efficiency; Gene expression; Gene expression regulation, bacterial.

1. Introdução

1.1 Listeriose

1.1.1 Agente causador

A listeriose é uma importante doença transmitida por alimentos (DTA), causada pela bactéria *Listeria monocytogenes*, bacilo gram-positivo, anaeróbio facultativo, fermentador de glicose, de característica extremamente ubíqua, tendo como habitat o solo, a água, os alimentos, além de colonizar grande número de hospedeiros invertebrados e vertebrados, conforme TRABULSI & ALTERTHUM (2008). Embora sua temperatura ideal de crescimento seja 37°C, é capaz de crescer numa faixa de temperatura entre 4°C e 45°C (psicrófila e mesófila), portanto, inclusive em temperatura de geladeira. Além disso, mesmo não sendo uma bactéria formadora de esporos, *L. monocytogenes* resiste aos efeitos de congelamento, aquecimento, secagem e altas concentrações de sal (até 20%). Também suporta ampla variação de pH (de 4,0 a 12,0 embora não haja consenso sobre os valores limítrofes exatos na literatura), caracterizando portanto, um grande problema para a indústria de alimentos, já que estas condições constituem grande parte dos principais processos de conservação empregados. É um patógeno intracelular facultativo, sobrevivendo e proliferando em enterócitos, macrófagos e hepatócitos, além de ser pleomórfico ou seja, altera sua morfologia conforme a fase da infecção no hospedeiro ou condições ambientais, não se confundindo portanto, com o polimorfismo.

Segundo o documento “*Surveillance system overview: the Listeria initiative*”, emitido em 2016 pelo Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) dos EUA, considera-se atualmente o gênero *Listeria* sendo composto por 7 (sete) espécies (*L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. seeligeri*, *L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. martii* e *L. grayi*), sendo *L. monocytogenes* patogênica para humanos e animais e embora infecte animais, *L. ivanovii* raramente é patogênica para o homem. Baseando-se na imunoreatividade de duas estruturas antigênicas (O e H), são reconhecidos 12 (doze) sorotipos distintos de *L. monocytogenes* (1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4b, 4c, 4d, 4e e 7), todos patogênicos para o

homem. Porém, os sorotipos 1/2a, 1/2b e 4b juntos são responsáveis por mais de 95% dos casos ocorridos, sendo 4b o mais incidente dentre eles (acima de 50%).

1.1.2 Patogênese e sintomatologia

Segundo MURRAY et al. (2014), a contaminação no homem, usualmente se dá pela ingestão de alimentos contaminados:

A) Leite *in natura* ou inadequadamente pasteurizado, assim como seus derivados, em particular os queijos preparados com estes ingredientes, os quais constituem meio para o crescimento de *L. monocytogenes*, frequentemente sendo a causa de surtos. Salienta-se que o leite adequadamente pasteurizado, também pode se tornar contaminado se houver contato com utensílios contaminados;

B) Água não tratada (não filtrada, não fervida e não clorada, dentre outros possíveis tratamentos) ou vegetais crus não lavados ou inadequadamente lavados, contaminados a partir do solo (reservatório natural) ou de fezes de animais hospedeiros;

C) Carne *in natura* (de mamíferos, aves, peixes e frutos do mar) ou processada (patês, embutidos, defumados, dentre outros) crua ou mal cozida. Ressalta-se ainda que alimentos com uma pequena quantidade de microrganismos podem se tornar altamente contaminados durante refrigeração prolongada, causando doença se o alimento não for cozido ou for cozido inadequadamente antes do consumo.

Segundo TRABULSI & ALTERTHUM (2008), a passagem pelo estômago constitui a primeira barreira contra a infecção. A dose infectiva ainda é indeterminada. Em indivíduos hígidos parece ser em torno de 10^9 células. Porém, acredita-se que varie conforme a presença de fatores de virulência na cepa que confirmam maior adaptação à sobrevivência em meios ácidos e também conforme a susceptibilidade do hospedeiro. Por exemplo, em indivíduos que façam uso de

antiácidos, há um aumento do pH do estômago, permitindo que uma maior quantidade de bactérias chegue ao intestino, reduzindo portanto, a dose infectiva.

Ocorrendo a passagem das células pelo estômago, haverá a instalação de uma gastroenterite extracelular febril, usualmente autolimitada, tendo como sintomas típicos diarreia, enjôo e vômito. No intestino, a bactéria adere à mucosa deste, induzindo a realização de uma fagocitose. Uma vez no fagossomo, havendo a presença de fatores de virulência específicos na cepa, a dupla membrana do fagossomo é dissolvida pela liberação de enzimas bacterianas antes da formação do fagolisossomo (o qual constituiria outra barreira contra a infecção) e então a bactéria escapa para o citoplasma dos enterócitos hospedeiros. No citoplasma ocorre a divisão celular. Novamente havendo a presença de fatores de virulência específicos na cepa, a partir da síntese de uma cauda formada por filamentos de actina, as bactérias se deslocam em direção aos enterócitos vizinhos. Ao chegarem na membrana plasmática, formam projeções em forma de pseudópodos, induzindo nova fagocitose e o ciclo recomeça, como demonstrado na Figura 1. Desta forma a infecção primária progride de forma silenciosa com pouco estímulo a produção de anticorpos, complemento e neutrófilos (VÁZQUEZ-BOLAND et al., 2001).

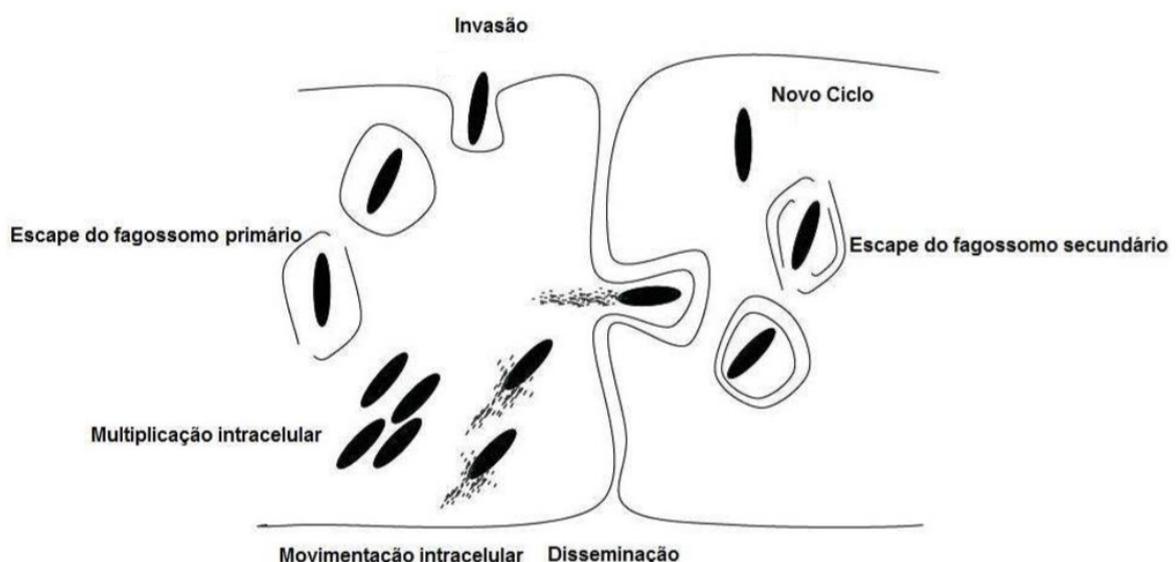


Figura 1 – Representação do ciclo de vida intracelular. Fonte: Adaptado de TRABULSI & ALTERTHUM (2008)

As bactérias que atravessam a barreira intestinal migram através do sistema circulatório para o baço e fígado e através do sistema linfático para os linfonodos mesentéricos e fígado. Em indivíduos com doenças do aparelho digestivo que causem lesões na mucosa gastro-intestinal (GI), tais como gastrite, úlcera, colite ulcerativa ou mesmo possuam infecção gastrointestinal prévia por outro patógeno, dentre outras, ocorre a passagem do patógeno diretamente para o sistema circulatório e assim a chegada do patógeno a estes órgãos ocorre de forma facilitada, tornando-os mais suscetíveis a desenvolver infecção invasiva. Embora ainda não totalmente elucidada, esta migração parece transcorrer através da invasão dos macrófagos pelo patógeno, de forma similar ao que ocorre nos enterócitos, mais uma vez gerando pouco estímulo ao sistema imune. Os hepatócitos constituem o sítio preferencial de multiplicação do patógeno. Uma vez no fígado, os hepatócitos respondem à presença das bactérias com a liberação de quimiocinas para os neutrófilos e pela indução de apoptose, levando a uma hepatite subclínica em indivíduos saudáveis, e consequente controle da infecção (RADOSHEVICH & COSSART, 2018).

Porém, em indivíduos imunodebilitados como neonatos, mulheres grávidas e idosos ou imunodeficientes como portadores de HIV, câncer, doenças auto-imunes e transplantados, não sendo possível o controle da infecção no fígado, ocorre bacteremia e consequente disseminação do patógeno para outros órgãos e tecidos, tendo como sintomas típicos febre aguda, mialgias, artralguas, dentre outros. O patógeno conhecidamente demonstra tropismo preferencial pela placenta e pelo sistema nervoso central, resultando assim nos quadros de infecção fetal, usualmente resultando em óbito ainda durante a gravidez e consequentemente aborto e no caso de adultos, meningite, encefalite e por vezes até o comprometimento do tronco encefálico (rombencefalite) e subsequentemente septicemia também resultando em óbito.

1.1.3 Diagnóstico, tratamento, taxas de incidência e mortalidade

Ainda conforme TRABULSI & ALTERTHUM (2008), o diagnóstico de rotina é realizado através de observação microscópica (coloração de Gram mostrando bacilos gram-positivos pleomórficos e mobilidade típica entre 10 e 25°C) e provas bioquímicas (produção de ácido a partir da glicose, hidrólise da esculina, reações positivas de Voges-Proskauer e vermelho metila), através de cultivo bacteriológico a 37°C durante 24 a 48 h, a partir de amostra de sítios estéreis do paciente (sangue, líquido cefalorraquidiano, placenta, líquido amniótico ou tecido fetal). Caso a amostra seja proveniente de alimentos (sítios não estéreis), a identificação envolve o cultivo em meio de cultura por até 15 dias, com a realização de repiques sucessivos a cada 5 dias para diversos tipos de meios seletivos.

A penicilina G ou ampicilina são considerados fármacos de escolha no tratamento das infecções por *Listeria*, podendo ser utilizadas em associação com a gentamicina, particularmente nos casos de bacteremia nos quais existe deficiência das funções das células T e em todos os casos de meningite. Para pacientes com intolerância às penicilinas, trimetoprim-sulfametoxazol pode ser considerado como alternativa (TEMPLE & NAHATA, 2000). Embora as cepas de *L. monocytogenes* também sejam suscetíveis à eritromicina, tetraciclina, rifampicina e cloramfenicol, estes antibióticos possuem apenas efeito bacteriostático não devendo ser ministrados (MURRAY, 2007). Cefalosporinas, são totalmente inefetivas, nunca devendo ser administradas em suspeitas de listeriose. Ainda, estudos demonstram que a associação de um aminoglicosídeo à penicilina ou ampicilina potencializa a atividade antimicrobiana (bactericida) destes antibióticos contra *L. monocytogenes*.

No Brasil, infelizmente a listeriose não constitui doença de notificação compulsória. Em consulta aos dados de mortalidade registrados no sistema Tabnet do DataSUS, os quais são disponibilizados no Apêndice I – Mortalidade geral no Brasil, categoria A32 da CID-10 (Listeriose), período 2007-2016, do presente trabalho, constatamos que no ano de 2016 houve registro de um único óbito no país. Repetindo a consulta para os 10 anos anteriores (incluindo 2016), foram encontrados um total de 50 registros, resultando numa taxa de mortalidade

média de 5 óbitos por ano. Tais dados sugerem que a ocorrência de listeriose é amplamente subdiagnosticada e subnotificada no país, provavelmente sendo o óbito computado na estatística de meningite, septicemia ou infecção bacteriana. Assim, faz-se necessária a busca de dados epidemiológicos de outros países.

Nos EUA os casos de listeriose constituem notificação compulsória ao CDC, órgão responsável pela vigilância epidemiológica. Segundo o documento “*Surveillance system overview: the Listeria initiative*”, emitido pelo órgão, o sistema de vigilância consiste no monitoramento contínuo da chegada de novas notificações, que tenham confirmação positiva realizada através de exame laboratorial, para aplicação de um extenso questionário ao paciente e familiares, com objetivo de rastrear o mais rapidamente possível a fonte de contaminação. Isso permite detectar ainda inicialmente a ocorrência de surtos e efetuar o recall do alimento contaminado, reduzindo a quantidade de pessoas infectadas, assim como detectar as pessoas já contaminadas o mais cedo possível e iniciar a terapêutica adequada, reduzindo a quantidade de óbitos. Outro objetivo importante é coletar amostras do paciente para realizar o sequenciamento de DNA do microrganismo e subsequente identificação do sorotipo. O cruzamento da sorotipagem é especialmente útil quando se tratam de casos isolados (ao contrário dos surtos), permitindo a realização de uma investigação mais ampla, com objetivo de identificar a fonte primária da contaminação (CDC, 2016).

O CDC adota como critério objetivo para classificação de listeriose invasiva o isolamento do patógeno em pelo menos um sítio estéril do paciente. Também quando constatada infecção invasiva na mãe e no feto, o CDC considera cada par mãe-feto como uma única ocorrência. A partir da leitura do Resumo Anual de Vigilância Epidemiológica de *Listeria* emitido pelo CDC, referente ao ano de 2014 (último relatório disponível no momento da elaboração desta dissertação), foram obtidos os seguintes dados:

A) No ano de 2014 foram reportados ao CDC 675 casos de listeriose, envolvendo 47 dos 50 estados da federação, dos quais 660 casos foram de listeriose invasiva, ou seja 98% dos casos reportados;

B) Conforme demonstrado na Tabela 1, o número de casos anuais reportados entre os anos de 2010 e 2014, evidenciam tratar-se de uma incidência estável e também sugerem uma tendência de ligeiro aumento do número de casos anuais;

Tabela 1 – Número de casos anuais de listeriose reportados nos EUA ao CDC e estados da federação envolvidos, entre os anos de 2010 e 2014. Fonte: Adaptado de CDC (2015)

	2010	2011	2012	2013	2014
<i>Estados reportados</i>	42	47	44	44	48
<i>Casos reportados</i>	577	621	582	646	675

C) A Figura 2 demonstra a dispersão geográfica dos casos reportados no ano de 2014. Dos 50 estados norte-americanos somente 3 estados não reportaram nenhum caso. Além disso, os estados que reportaram maior quantidade de casos (Nova Iorque, Califórnia, Flórida e Pensilvânia) estão entre os 5 estados mais populosos dos EUA e os estados que não reportaram nenhum caso (Alaska, Dakota do Sul e Wyoming) estão entre os 5 estados menos populosos dos EUA. Todos estes dados contribuem para reforçar a característica ubíqua do microrganismo e sugere uma relação direta entre incidência e tamanho da população, independentemente da localização, ou seja, que a taxa de incidência possivelmente seja uniforme;

D) Dos 660 casos de listeriose invasiva, 81% foram diagnosticados através da detecção do patógeno em amostras de sangue, 13% em amostras de LCR e 6% em outros tecidos normalmente estéreis;

E) Ainda acerca dos casos de listeriose invasiva, os casos associados à gestação corresponderam a 15% do total de casos ocorridos. Dos 85% não associados, pode-se inferir a partir da observação da distribuição por faixa etária e gênero apresentada na Figura 3, que salvo oscilações, não há indicação de maior incidência associada a nenhum dos gêneros. Além disso, os dados demonstram notório aumento do número de casos a partir dos 60 anos de idade.

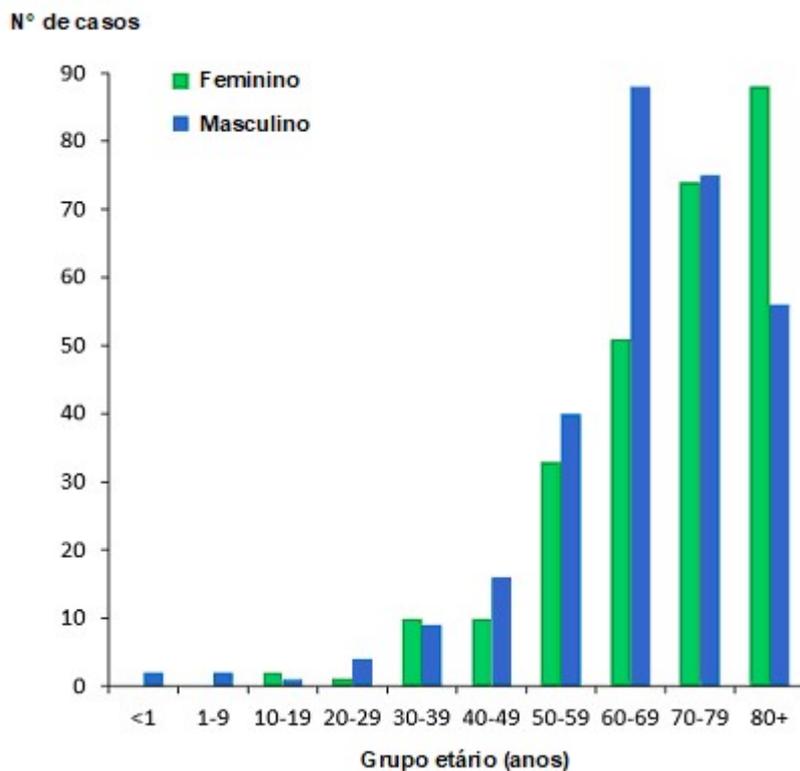


Figura 3 – Número de casos anuais de listeriose invasiva não associada à gravidez, reportados nos EUA ao CDC no ano de 2014, segregados por faixa etária e gênero. Fonte: CDC (2015)

F) Também com relação aos casos de listeriose invasiva reportados, a Tabela 2 demonstra que 57% dos casos foram decorrentes do sorotipo 4b e 96% dos casos foram decorrentes dos sorotipos 1/2a, 1/2b e 4b, ratificando informação já citada anteriormente;

Tabela 2 – Prevalência de sorotipos dos casos anuais de listeriose invasiva reportados nos EUA ao CDC no ano de 2014. Fonte: CDC (2015)

Sorotipo	n	%
4b	299	57%
1/2a	139	26%
1/2b	66	13%
Outros sorotipos	16	3%
Não identificado	7	1%

G) Por fim, o resumo revela que dentre os 660 casos de listeriose invasiva, a taxa de mortalidade foi de 23%. De fato, a incidência anual de casos de listeriose nos EUA reportados ao CDC, com confirmação através de exame laboratorial é de cerca de 800 casos, resultando numa taxa de 0,24 casos por 100.000 hab. Porém, o próprio CDC reconhece no documento “*Surveillance system overview: the Listeria initiative*”, emitido em 2016, que muitos casos não são reportados ou corretamente diagnosticados e estima que considerando os mesmos ocorram cerca de 1.600 casos anuais de listeriose nos EUA, implicando uma taxa de incidência de 0,48 casos/100.000 hab, dos quais cerca de 1.500 demandem hospitalização e cerca de 260 resultem em óbito, o que caracteriza uma taxa de mortalidade de 16,2%. Além disso, a listeriose constitui a terceira principal causa de morte por DTA nos Estados Unidos e que aproximadamente 25% dos casos associados à gravidez resulte em aborto espontâneo ou morte do recém-nascido.

Na União Européia os casos de listeriose também constituem notificação compulsória, sendo a vigilância epidemiológica realizada através do sistema RASFF (Rapid Alert System for Food and Feed). Conforme LUTHA et al. (2019), no ano de 2016 foram reportados um total de 2.536 casos de listeriose humana, implicando uma taxa de incidência de 0,47 casos/100.000 hab, configurando inclusive a mais alta taxa de hospitalização dentre todas as DTAs sob vigilância na União Européia, dos quais resultou uma taxa de mortalidade de 16,2%, dados muito semelhantes aos divulgados pelo CDC.

Sintetizando, a listeriose ocorre em todo o globo terrestre, aparentemente não havendo qualquer influência da localização geográfica ou gênero sobre sua taxa de incidência, porém, sendo mais incidente em indivíduos imunodeficientes e imunocomprometidos. Em razão da rápida evolução da infecção após os pacientes demandarem hospitalização, o diagnóstico usual ser realizado através de cultivo bacteriológico e provas bioquímicas e geralmente a listeriose não constituir suspeita inicial da equipe médica, a antibioticoterapia muitas vezes é iniciada tardiamente. Assim embora seja caracterizada por uma baixa incidência, a listeriose está associada a uma alta taxa de mortalidade. Corroborando com

estas afirmações, BEGLEY et al. (2006) afirmam que mesmo com a antibioticoterapia iniciada, um terço dos pacientes morrem.

1.1.4 Principais fatores de virulência

L. monocytogenes possui um verdadeiro arsenal de genes de virulência (VERA et al., 2013). A seguir são descritos alguns dos principais fatores de virulência, segundo TRABULSI & ALTERTHUM (2008), os quais também são representados na Figura 4:

A) Proteínas Mediadoras da Resposta ao Estresse (ClpC, ClpE e ClpP)

São proteínas que funcionam como chaperonas, auxiliando na montagem ou na reconformação adequada de proteínas danificadas pelo estresse ou que funcionam como proteases, degradando as proteínas danificadas para o correto funcionamento das vias fisiológicas de síntese de novas proteínas. São fundamentais por exemplo para a tolerância da bactéria às condições de pH ácido encontradas no estômago.

B) Internalinas (InIA e InIB)

São proteínas que funcionam como invasinas, induzindo a internalização da bactéria em células epiteliais não-fagocíticas. Ambas apresentam em comum um domínio repetido rico em leucina (LRR), porém, com receptores e vias de sinalização celular distintas para indução da internalização. InIA é uma proteína de 800 aminoácidos, contendo 15 unidades LRR, as quais se ligam à E-caderina da célula hospedeira, promovendo assim a adesão bacteriana e posterior indução da fagocitose. A E-caderina está presente nas junções gap e porções basolaterais dos enterócitos, na superfície dos hepatócitos, células endoteliais da microvasculatura cerebral, células epiteliais que recobrem o plexo coroidal e nas vilosidades coriônicas da placenta, todos sítios-alvo da infecção por *L. monocytogenes*. Já InIB é uma proteína de 630 aminoácidos com 7 unidades LRR, a qual parece se ligar a uma quinase (Met), induzindo a fosforilação de várias proteínas intracelulares envolvidas no controle do citoesqueleto de actina, o

que resulta por fim, igualmente na indução da fagocitose em uma ampla variedade de tipos celulares, incluindo linhagens epiteliais, células endoteliais, fibroblastos e hepatócitos. A ausência da expressão de InIs, implica na ausência de virulência do microrganismo, uma vez que não possuirá capacidade de invasão das células do hospedeiro.

C) Listeriolisina O (LLO)

Considerada como um dos principais fatores de virulência da *L. monocytogenes*, consiste numa hemolisina pertencente à família das toxinas formadoras de poros, colesterol dependentes, responsável pela lise da membrana do fagossomo formado na invasão do enterócito, bem como pela lise da dupla membrana do vacúolo formado durante a disseminação da bactéria célula a célula. A perda da capacidade de sintetizar LLO, implica na perda de virulência do microrganismo uma vez que se tornam incapazes de escapar da digestão lisossomal.

D) Fosfolipases C (PlcA e PlcB)

L. monocytogenes sintetiza 2 fosfolipases C. PlcA é específica para a degradação de fosfatidilinositol e seu papel parece ser de potencializar o efeito de PlcB. Já PlcB é capaz de degradar a maioria dos fosfolipídios de membrana, tendo papel fundamental na patogênese do microrganismo, levando a total dissolução da parede do fagossoma e vacúolo, previamente degradadas pela LLO. A ausência de Plcs, não elimina a virulência dos microrganismos, embora reduza a eficiência de escape dos fagossomos em aproximadamente 50%.

E) Fator de Nucleação de Actina (ActA)

Consiste numa proteína secretada pela bactéria, responsável pela polimerização da actina, formando uma longa cauda, responsável pela motilidade bacteriana através do citoplasma, o que possibilita a migração do patógeno entre células vizinhas do hospedeiro.

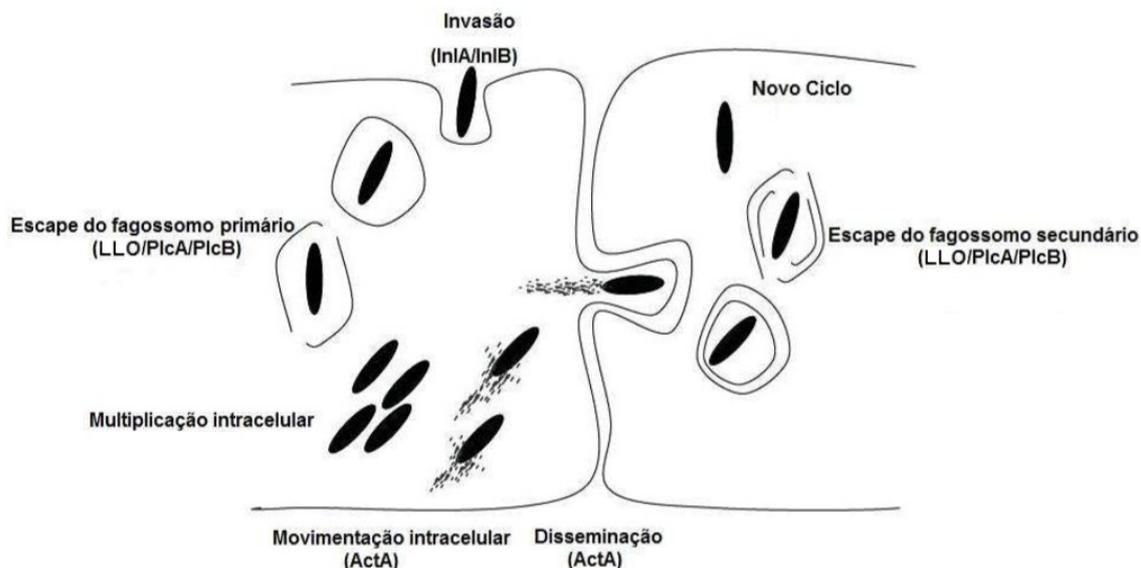


Figura 4 – Representação dos principais fatores de virulência sobre o ciclo de vida intracelular. Fonte: Adaptado de TRABULSI & ALTERTHUM (2008)

1.2 Bacteriocinas

1.2.1 Definição

Conforme JACK et al. (1995), bacteriocinas consistem em peptídeos, sintetizados ribossomalmente, originalmente identificados em bactérias gram-positivas produtoras de ácido láctico (LABs), os quais apresentam espectro restrito de atividade antimicrobiana, geralmente limitado aos microrganismos presentes no ambiente em que a espécie produtora se encontra. JACK et al. (1995) já utilizavam em seu trabalho o termo “bacteriocin-like molecules” para fazer referência a compostos com características semelhantes a bacteriocinas (espectro de atividade antimicrobiana restrito e massa molecular reduzida, dentre outras), mas que ainda não eram bem caracterizados. Conforme o trabalho de SOMMA et al. (2020), atualmente já são identificadas a produção de moléculas semelhantes à bacteriocinas em espécies dos seis domínios/reinos (*Bacteria*, *Archaea*, *Protista*, *Fungi*, *Plantae* e *Animalia*).

Segundo JOZALA et al. (2015), além de sintetizadas nos ribossomos e possuírem espectro de atividade restrito, as bacteriocinas são produzidas através do metabolismo primário e não há conhecimento de nenhum caso de toxicidade para o ser humano, tendo sua principal utilização a indústria de alimentos. Já os

antibióticos decorrem do metabolismo secundário, são sintetizados por enzimas, possuem amplo espectro de atividade, e podem apresentar toxicidade, tendo sua principal utilização na clínica médica, como sintetizado na Tabela 3.

Tabela 3 – Principais diferenças entre bacteriocinas e antibióticos. Fonte: JOZALA et al. (2015)

Característica	Bacteriocina	Antibiótico
Produção	Metabolismo primário	Metabolismo secundário
Local de síntese	Ribossomos	Enzimas
Atividade	Espectro limitado	Espectro amplo
Toxicidade	Não evidenciada	Sim
Aplicação	Alimentos	Clínica

Interessante ressaltar que os organismos produtores são imunes às suas próprias bacteriocinas, propriedade que é mediada por proteínas de imunidade específica (COTTER et al., 2005). Além disso, algumas bacteriocinas, como a citolisina, podem atuar inclusive sobre células eucarióticas, constituindo assim fatores de virulência.

Conforme JOZALA et al. (2015) e SOMMA et al. (2020), em consulta aos principais bancos de dados de bacteriocinas produzidas por bactérias (APD, BACTIBASE e BAGEL), atualmente já constam mais de 355 sequências identificadas. Ainda conforme o trabalho de SOMMA et al. (2020), se ampliarmos os organismos produtores para os seis domínios/reinos, serão encontradas no APD mais de 3180 sequências identificadas. COTTER et al. (2005), descrevem como principais produtores gram-positivos de bacteriocinas os gêneros *Bacillus*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus* e *Streptococcus*, e como principais produtores gram-negativos as espécies *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Serratia marcescens*.

1.2.2 Classificação e mecanismos de ação

A elaboração de uma classificação das bacteriocinas com base em seu espectro de atividade antimicrobiana se demonstrou inviável, pois muitos compostos apresentavam o mesmo perfil de atividade. Assim, baseando-se em

diferenças existentes entre algumas propriedades físicas, químicas e biológicas, foi proposto por KLAENHAMMER (1993) uma primeira classificação originalmente composta por 4 classes, conforme representado na Tabela 4.

Tabela 4 – Classificação originalmente proposta para as bacteriocinas. Fonte: KLAENHAMMER (1993)

Classificação	Características	Exemplos
Classe I		
Bacteriocinas com lantionina (lantibióticos)	a) Possuem resíduos de lantionina e β -metil lantionina; b) Sofrem modificação pós-traducional.	nisina, mersacidina, citolisina
Classe II		
Bacteriocinas sem lantionina	a) Não sofrem modificação pós-traducional; b) Baixa massa molecular (<10kDa).	pediocina, enterocina, leucocina
Classe III		
Bacteriolisinas	a) Não sofrem modificação pós-traducional; b) Alta massa molecular (>30kDa).	lisostafina, enterolisina A
Classe IV		
Bacteriocinas complexas	a) Compostas por uma porção proteica e uma ou mais porções não-proteicas (carboidrato ou lipídio)	

Segundo COTTER et al. (2005), as bacteriocinas da classe I compreendem os lantibióticos, ou seja, pequenos peptídeos (19-38 aminoácidos de comprimento) que possuem atividade antimicrobiana e contêm resíduos de lantionina e/ou β -metil lantionina em sua estrutura, os quais são obtidos através de modificação pós-traducional.

Embora o exato mecanismo de ação ainda não tenha sido completamente elucidado para todos os lantibióticos, já é bem estabelecido que na grande maioria dos casos a molécula de Lipídio II (undecaprenil-pirofosfato-MurNAc(pentapeptídeo)-GlcNAc) da membrana celular bacteriana constitui o alvo do peptídeo, fato que foi relatado pela primeira vez por BROTZ et al. (1998). Lipídio II tem uma participação essencial na síntese da parede celular bacteriana pela translocação de subunidades de peptidoglicanos através da membrana celular. Ligando-se ao Lipídio II, os lantibióticos impedem a transferência de precursores necessários à síntese da parede celular. WIEDEMANN et al. (2001), estabeleceram que os lantibióticos possuíam ainda um segundo mecanismo de ação, uma vez que a ligação do peptídeo ao Lipídio II, também resulta na formação de poros ou canais na membrana celular, através dos quais ocorre a depleção de componentes essenciais, como íons K^+ , aminoácidos e ATP,

resultando na despolarização da membrana e morte celular. Ambos mecanismos são demonstrados na Figura 5.

Posteriormente, conforme COTTER et al. (2013), com a descoberta de grande quantidade de novas bacteriocinas, foi necessária a subdivisão desta classe em 12 subclasses, baseando-se na similaridade química da sequência do pró-peptídeo não-modificado, conforme apresentado na Tabela 5.

Ainda conforme COTTER et al. (2005), a classe II de bacteriocinas compreende basicamente peptídeos sem modificação pós-traducional, dispensando portanto a maquinaria adicional necessária no caso dos lantibióticos. Além disso, possuem massa molecular reduzida (menor que 10 kDa), são termoestáveis e com boa atividade antimicrobiana, como a título de exemplo, a pediocina.

Estabelecido pela primeira vez por RAMNATH et al. (2000), seu mecanismo de ação se baseia na interação da extremidade C-terminal dos peptídeos com a manose presente na membrana celular das células bacterianas sensíveis, formando o complexo irreversível manose-fosfotransferase (Man-PTS), resultando também na formação de poros que permitirão a depleção de íons e ATPs, promovendo a morte celular, conforme se observa na Figura 5.

Segundo COTTER et al. (2013), também em decorrência da descoberta de grande quantidade de novas bacteriocinas, foi necessária a subdivisão desta classe em 5 subclasses, conforme apresentado na Tabela 5.

Importante ressaltar que a classe III proposta por KLAENHAMMER (1993), compreende compostos de massa molecular elevada (acima de 30 kDa), que apresentam atividade lítica, os quais atualmente não são mais considerados bacteriocinas (em razão da massa molecular elevada), tendo sido por esta razão suprimida da classificação proposta por COTTER et al. (2013). Tais compostos são atualmente classificados como enzimas líticas, sob a denominação de bacteriolisinas. Conforme (COTTER et al. 2005), além das características já mencionadas, as bacteriolisinas não sofrem modificação pós-traducional, são termolábeis e seu mecanismo de ação consiste em catalisar a hidrólise da parede celular, conforme representado na Figura 5.

Tabela 5 – Classificação atualizada das bacteriocinas. Fonte: COTTER et al. (2013)

Grupo	Características	Exemplos
Classe I		
Bacteriocinas tipo MccC7-C51	É anexada covalentemente ao C-terminal do ácido aspártico	MccC7-C51
Peptídeos Lasso	Possuem estrutura lasso	MccJ25
Peptídeos contendo azolina ou azol linear	Possuem heterociclos, sem nenhuma outra modificação	MccB17
Lantibióticos	Possuem pontes de lantionina	Nisina, planosporicina, mersacidina, actagardina, mutacina 1140
Linaridinas	Possuem estrutura linear e contém amino ácidos desidratados	Cipemicina
Proteusinas	Contém múltiplas hidroxilações, epimerizações e metilações	Politeonamida A
Sactibióticos	Contém ligações Enxofre-C _α	Subtilosina A, Turicina CD
Cianobactinas patellamida-like	Possuem heterociclos e sofrem macrociclização	Patelamida A
Cianobactinas anaciclamida-like	Peptídeos cíclicos, consistindo de amino ácidos proteinogênicos com prenis anexos	Anaciclamida A10
Tiopeptídeos	Contém uma piridina central, dihidropiridina ou anel de piperidina, assim como heterociclos	Tiostrepton, nocatiacina I, GE2270A, filipimicina
Botromicinas	Contém amidina macrocíclica, tiazol com C-terminal descarboxilado e amino ácidos cabono-metilados	Botromicina A2
Glicocinas	Contém glicopeptídeos ligados à enxofre	Sublancina 168
Classe II		
Peptídeos IIa	Peptídeos tipo pediocina-like	Pediocina PA-1, enterocina CRL35, carnobacteriocina BM1
Peptídeos IIb	Necessidade de dois ou mais peptídios não modificados para apresentar atividade	ABP118, lactacina F
Peptídeos IIc	Peptídeos cíclicos	Enterocina AS-48
Peptídeos IId	Peptídeos individuais, não modificados, lineares, não pediocina-likes	MccV, MccS, epidermicina NI01, lactococina A
Peptídeos IIe	Contém uma região C-terminal rica em serina, com uma modificação não ribossomal tipo sideóforo	MccE492, MccM

De igual maneira, a classe IV proposta por KLAENHAMMER (1993), em razão de compreender compostos formados por uma porção proteica e uma ou mais porções não-proteicas associadas, tal como carboidratos ou lipídios, os quais atualmente também não são mais considerados bacteriocinas, foi igualmente suprimida da classificação proposta por COTTER et al. (2013).

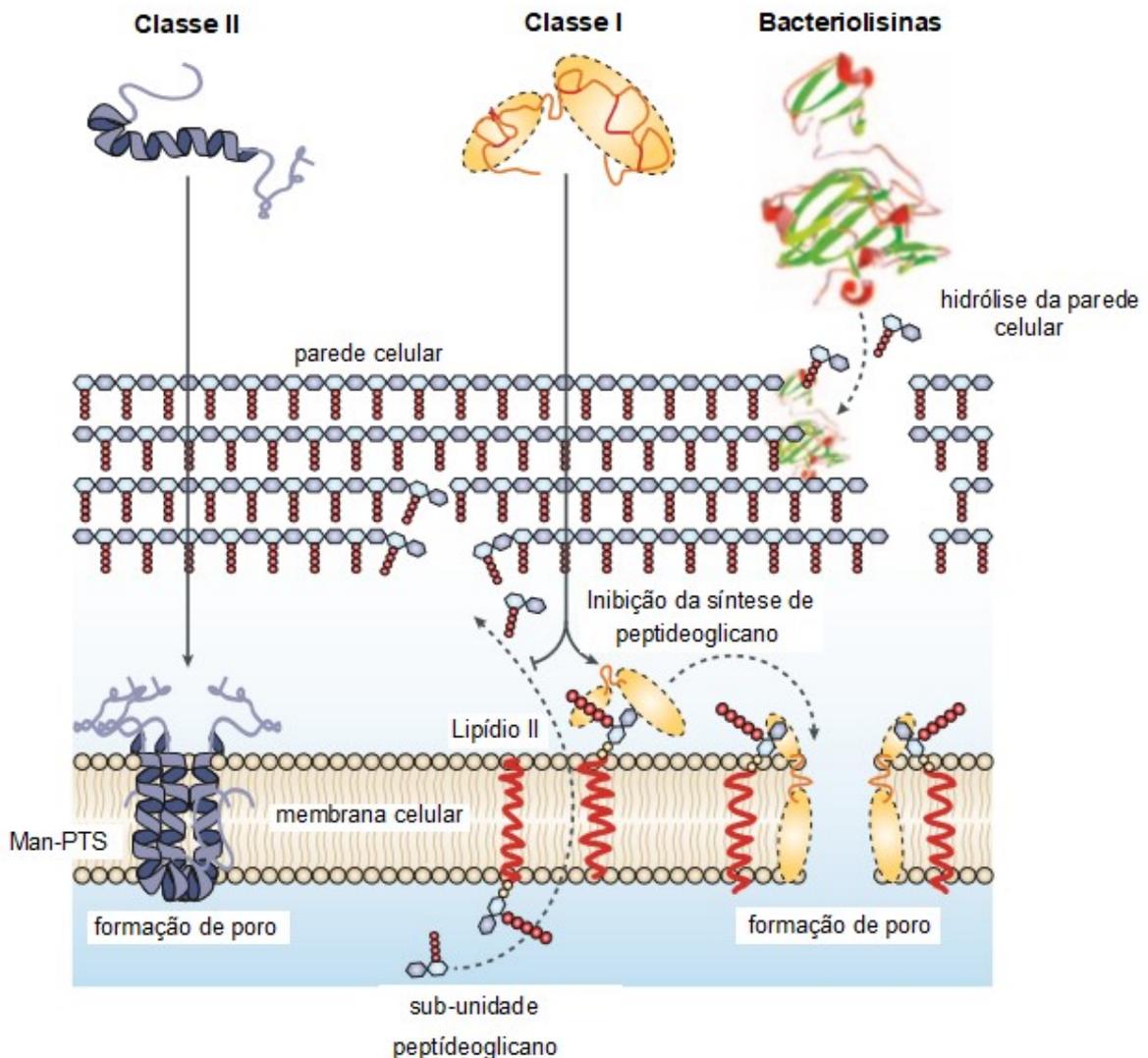


Figura 5 – Mecanismo de ação das bacteriocinas e bacteriolisinas. Fonte: COTTER et al. (2005)

1.2.3 Lantibióticos

Como descrito anteriormente, os lantibióticos contêm resíduos não usuais de lantionina e/ou β -metil lantionina em sua estrutura. Conforme COTTER et al. (2005), estes resíduos formam ligações covalentes entre os aminoácidos, resultando na formação de anéis internos que proporcionam aos lantibióticos sua estrutura característica. Além disso, os lantibióticos também podem conter outros resíduos não usuais, como a dehidroalanina (Dha) e a dehidrobutirina (Dhb).

Ainda segundo COTTER et al. (2005), todos os resíduos não usuais decorrem de modificações pós-traducionais, as quais são necessárias para que a molécula se torne ativa. Através destas modificações, a serina é desidratada enzimaticamente, formando a dehidroalanina (Dha), a qual se condensa com o grupo sulfidríla de uma cisteína vizinha, formando uma ponte covalente tioéter, constituindo assim a lantionina (caracterizada por uma alanina, uma ponte tioéter e outra alanina). Quando a molécula desidratada enzimaticamente for uma treonina, resultará na formação da dehidrobutirina (Dhb), constituindo assim após a condensação com o grupo sulfidríla numa β -metil lantionina (caracterizada por uma butirina, uma ponte tioéter e outra alanina). Para melhor compreensão, as modificações descritas podem ser visualizadas a nível de peptídeo e a nível molecular nas Figuras 6 e 7 respectivamente.

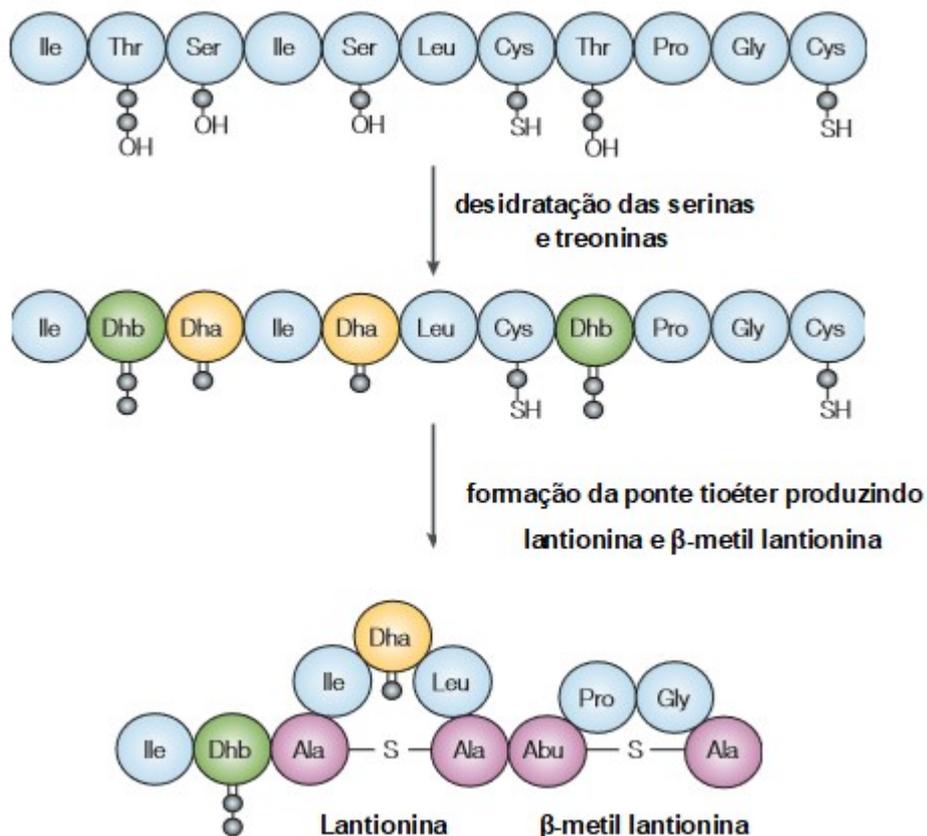


Figura 6 – Representação das modificações pós-traducionais na síntese da nisina, em nível de peptídeo. Fonte: Adaptado de COTTER et al. (2005)

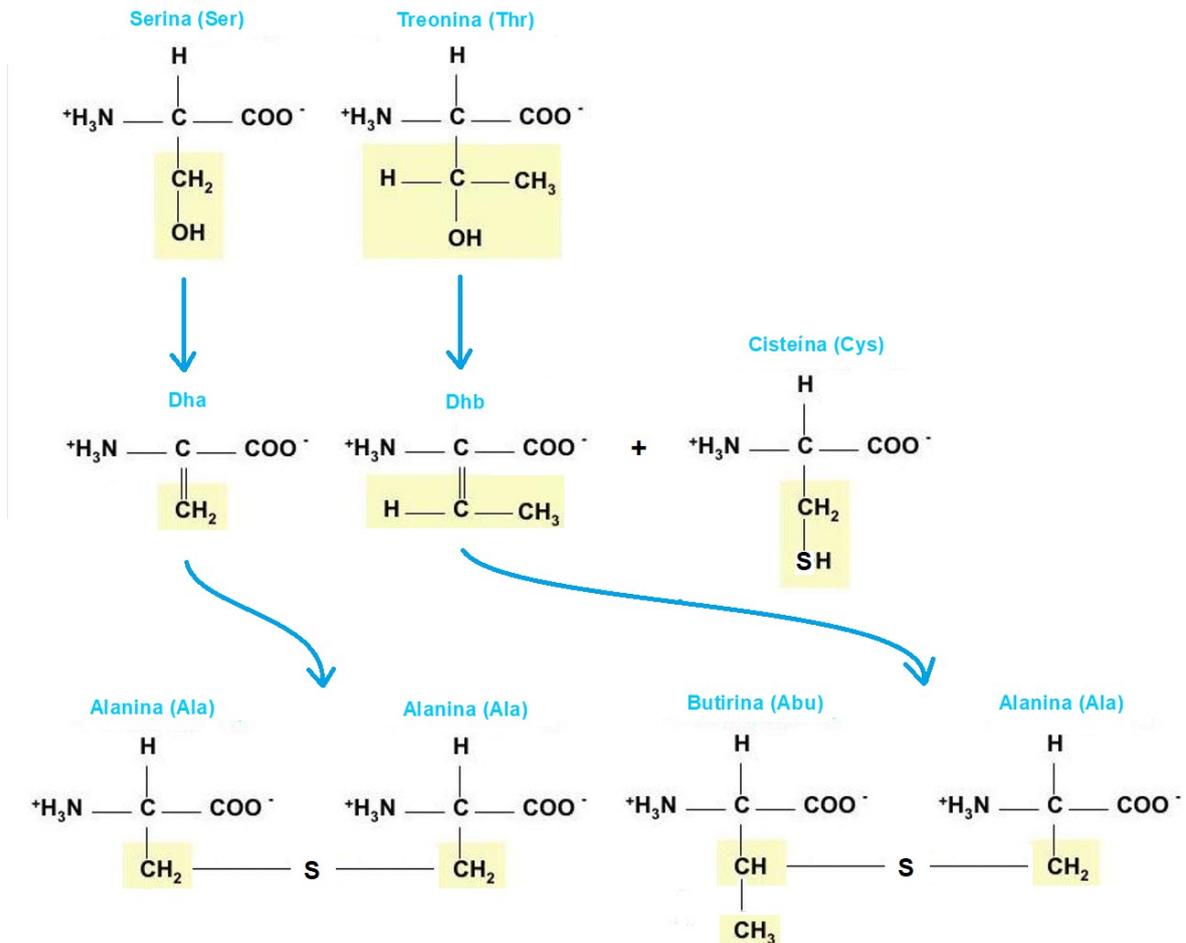


Figura 7 – Representação das modificações pós-traducionais na síntese da nisina, em nível molecular. Fonte: Adaptado de FREEMAN (2005)

1.2.4 Biossíntese da nisina

Segundo COTTER et al. (2005), nisina é um lantibiótico, produzido pela bactéria *Lactococcus lactis*, bastante eficaz contra bactérias gram-positivas, em particular *L. monocytogenes* e *Bacillus cereus*.

O operon da nisina é constituído por seu gene codificador (*nisA*), as enzimas responsáveis pelas modificações pós-traducionais (*nisB* e *nisC*), a protease responsável pela clivagem do peptídeo líder (*nisP*), o transportador (*nisT*), os genes de regulação (*nisR* e *nisK*) e os genes de imunidade (*nisI*, *nisF*, *nisE* e *nisG*), conforme representado na Figura 8.

A biossíntese da nisina é constituída por 4 etapas, desidratação, ciclização, excreção e proteólise. A expressão do gene *nisA* resulta na síntese do peptídeo precursor da nisina (pró-peptídeo), acrescido de uma sequência líder na região N-terminal, o qual se acredita que tenha a função de manter o peptídeo inativo até sua exportação para fora da célula. A seguir, é realizada a desidratação dos resíduos de serina e treonina através da enzima codificada pelo gene *nisB*. A desidratação é seguida pela formação das pontes de tioéter entre os resíduos de Dha e Dhb com os resíduos de cisteína através da enzima ciclase, a qual é codificada pelo gene *nisC*.

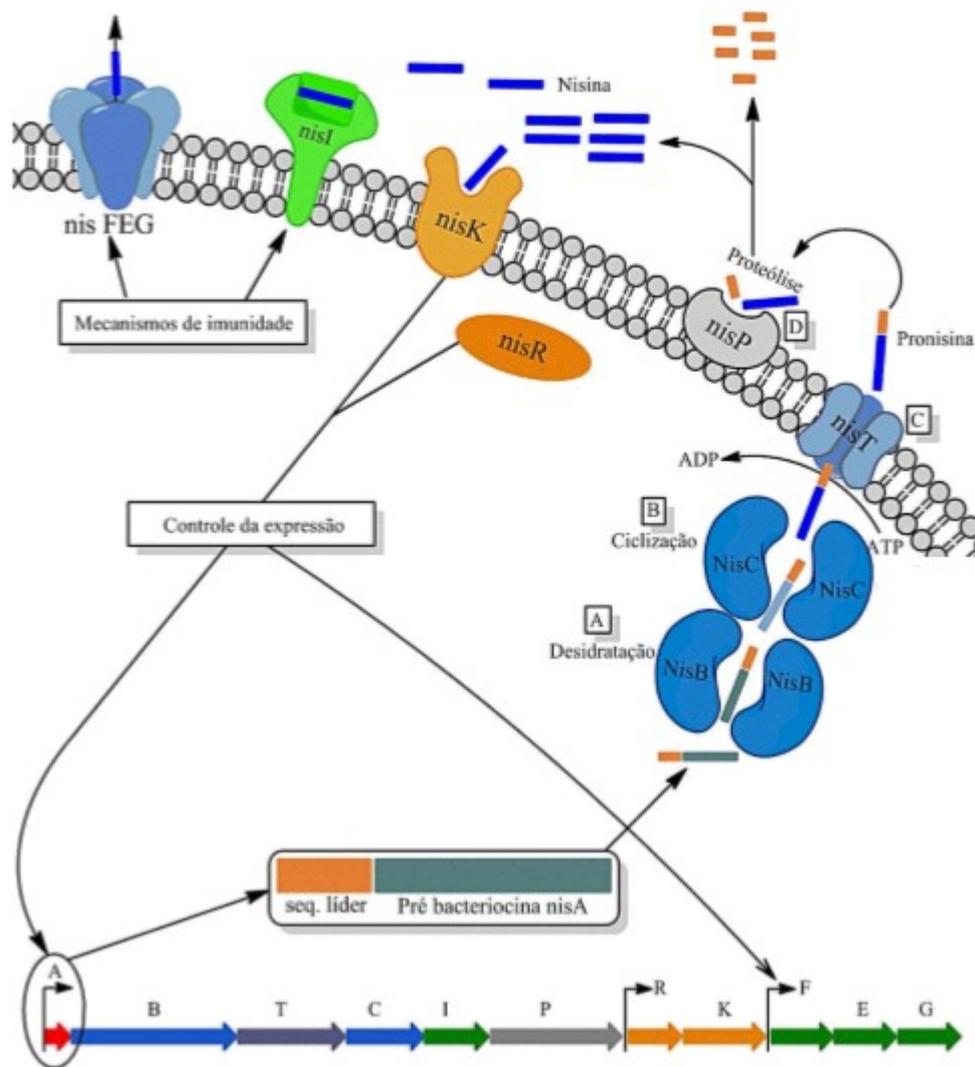


Figura 8 – Representação da biossíntese da nisina. Fonte: Adaptado de PATTON & VANDER DONK (2005)

Por fim, o peptídeo inativo é transportado através da membrana celular pelo transportador NisT. Já do lado externo da membrana, a sequência líder é clivada do peptídeo através da protease codificada por *nisP*, tornando assim o peptídeo ativo. Os peptídeos livres produzidos se ligam aos receptores de membrana codificados por *nisR* e *nisK*, integrantes do mecanismo de regulação da expressão da nisina e expressão da imunidade. O complexo *nisF/E/G* codifica o transportador que levará o peptídeo ativo da membrana para o meio extracelular. Por fim, *nisl* consiste numa proteína ancorada na membrana celular, essencial para a manutenção da imunidade à nisina, mas de mecanismo ainda não elucidado.

1.2.5 Estrutura e propriedades da nisina

Na sua forma inativa, a molécula de nisina é composta por 57 aminoácidos, sendo 23 resíduos na região líder e 34 resíduos na região estrutural. Após as modificações pós-traducionais, os 34 resíduos são compostos por oito alaninas, quatro ácidos aminobutíricos, três glicinas, três isoleucinas, três lisinas, duas leucinas, duas histidinas, duas metioninas, uma serina, uma valina, uma prolina e uma asparagina. Além disso, estão presentes duas Dhas e uma Dhb, as quais não formaram lantioninas nem β -metil lantioninas, conforme representado na Figura 9.

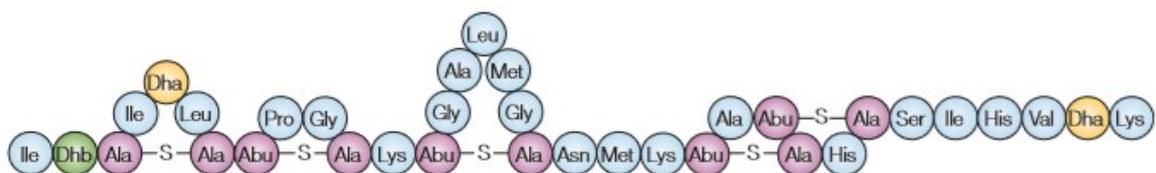


Figura 9 – Sequência de peptídeos da molécula de nisina A. Fonte: COTTER et al. (2005)

Conforme GHARSALLAOUI et al. (2016), nisina apresenta uma massa molecular de 3,5 kDa, porém, o peptídeo também é capaz de formar dímeros (7 kDa) e tetrâmeros (14 kDa). Além disso, foi identificada a existência de algumas variações da molécula de nisina apresentada acima, a qual recebeu a denominação de nisina A. Uma variante relevante é a nisina Z, a qual difere apenas pela substituição da histidina na posição 27 da nisina A por uma

asparagina na nisina Z. Esta substituição resulta em pequena diferença na estabilidade térmica, variação da atividade em função do pH, sensibilidade às enzimas proteolíticas e espectro de ação antimicrobiana. Porém, há um aumento da solubilidade de nisina Z próximo ao pH neutro em razão da asparagina possuir uma cadeia lateral mais polar que a histidina. Já nisina Q apresenta substituição de outros 3 aminoácidos além da histidina na posição 27 (alanina por uma valina na posição 15, metionina por leucina na posição 21 e isoleucina por valina na posição 30), fato que altera bastante suas propriedades em relação à nisina A, em particular a atividade antimicrobiana. As variantes mencionadas podem ser melhor visualizadas através da Figura 10.

A solubilidade em meio aquoso, estabilidade térmica e atividade antimicrobiana da nisina são altamente dependentes do pH do meio (JOZALA et al., 2015; GHARSALLAOUI et al., 2016). A título de exemplo, em pH 2,0, a solubilidade da nisina é de 57 mg/mL, passando para 0,25 mg/mL em pH 5,0 e praticamente insolúvel em pH neutro ou alcalino. Isso decorre principalmente da presença de três resíduos de lisina e dois de histidina de caráter básico na molécula de nisina, em oposição a nenhum aminoácido de caráter ácido (aspartato ou glutamato).

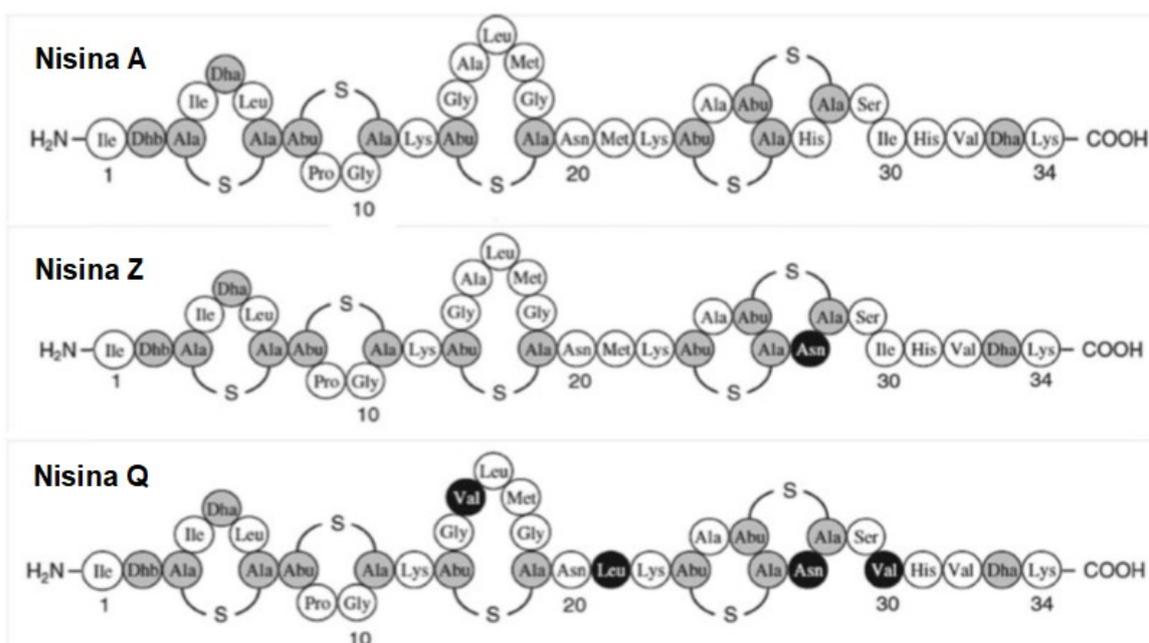


Figura 10 – Principais variantes da nisina. Fonte: GHARSALLAOUI et al. (2016)

Também possui caráter anfipático em razão da predominância de resíduos hidrofóbicos na região N-terminal (isoleucina, alanina, leucina, prolina e glicina) e predominância de resíduos hidrofílicos na região C-terminal (lisina, histidina e serina). Em razão da carga elétrica resultante positiva, a nisina é classificada como um peptídeo antimicrobiano catiônico (CAMP).

Quanto à estabilidade térmica, as moléculas de nisina suportam autoclavagem (121°/15 min) em pH 2,0, sem nenhuma perda da atividade, porém, em pH 5,0 já ocorre uma redução de 40% e em pH neutro a redução é da ordem de 90%. Isso decorre principalmente das 5 pontes tioéter formadas. O fato de ser relativamente termoestável, mantendo sua conformação em temperaturas de até 120 °C, apresentar baixíssima citotoxicidade e ser degradada por enzimas do sistema digestivo, torna a nisina indicada para o emprego na conservação de alimentos. Em razão disso, a substância obteve em 1988 o certificado de geralmente reconhecido como seguro (GRAS), pelo *Food and Drug Administration* (FDA) dos EUA, o qual atesta a livre utilização do produto sem causar nenhum dano a curto e/ou longo prazo à saúde humana, sendo até hoje o único peptídeo antimicrobiano autorizado pelo FDA para uso como conservante natural de alimentos.

Ainda segundo JOZALA et al. (2015), dependendo de sua concentração, a nisina pode ter efeito bacteriostático ou bactericida contra bactérias gram-positivas. Além disso, a atividade da nisina sobre estas bactérias ocorre em duas etapas distintas, a primeira consiste na adsorção não específica da nisina pela parede celular. Essa adsorção é reversível e dependente da concentração utilizada, do pH do meio (solubilidade da nisina) e da presença de cátions divalentes e trivalentes. Nesta etapa a nisina permanece sensível às proteases das células bacterianas. Na segunda etapa, a nisina se liga ao lipídio II da membrana celular, tornando-se insensível às proteases e promovendo o duplo mecanismo de ação explicado anteriormente.

Além disso, em geral bactérias gram-negativas são resistentes à nisina, uma vez que a membrana celular externa, composta por lipossacarídeos atua como barreira à entrada da nisina. Porém, como demonstrado pela primeira vez

por STEVENS et al. (1991), a ruptura da membrana externa por outros meios torna as bactérias gram-negativas sensíveis à bacteriocina.

Quanto à inibição da germinação de esporos bacterianos é conhecido que os resíduos de Dha e Dhb presentes na molécula de nisina interagem com os grupos sulfidríla vitais presentes na membrana celular de esporos recém-germinados, resultando na inibição do esporo (JOZALA et al., 2015).

1.2.6 Desenvolvimento de resistência

Conforme VAUCHER et al. (2017), nisina tem sido utilizada por mais de 50 anos como conservante alimentar, sem o desenvolvimento substancial de resistência bacteriana e até recentemente acreditava-se que as bactérias não poderiam desenvolver resistência aos peptídeos antimicrobianos. Porém, estudos envolvendo a estrutura, atividade e expressão gênica de diversos microrganismos, começam a demonstrar que o uso de bacteriocinas podem induzir o desenvolvimento de resistência em alguns alvos bacterianos.

Segundo COTTER *et al.* (2013), diversos mecanismos de resistência têm sido identificados, dentre eles:

- Alterações na parede celular reduzindo a acessibilidade da bacteriocina ao seu receptor na membrana celular (espessura e carga elétrica, dentre outros);
- Alterações na membrana celular reduzindo a acessibilidade da bacteriocina a alvos intracelulares (carga elétrica e fluidez, dentre outros);
- Redução na expressão de receptores situados na membrana celular, como por exemplo o sistema manose-fosfotransferase;
- Mutação nos genes que codificam alvos intracelulares;
- Desenvolvimento ou aumento da expressão de proteases que promovam a clivagem proteolítica das bacteriocinas;
- Desenvolvimento de genes de imunidade (*immune mimicry*).

Algumas soluções potenciais incluem a modificação das bacteriocinas para criar compostos que possam se ligar aos receptores sempre que ocorrer uma

mutação no gene que expressa o receptor, a modificação das bacteriocinas para reduzir sua sensibilidade às proteases ou o uso combinado das bacteriocinas com outras bacteriocinas ou mesmo antibióticos, que apresentem mecanismos de ação distintos.

1.3 Lipossomos

1.3.1 Definição

A encapsulação de peptídeos antimicrobianos em nanoestruturas, tais como nanopartículas, nanofibras, nanotubos e lipossomos dentre outras, têm demonstrado vantagens na maioria das suas aplicações, comparativamente ao emprego dos peptídeos livres. Desta forma, o encapsulamento da nisina em nanoestruturas como os lipossomos, talvez possa constituir uma alternativa ao desenvolvimento da resistência de *L. monocytogenes* à nisina.

Os fosfolipídios são formados por uma cabeça polar hidrofílica ou lipofóbica e uma cauda apolar, hidrofóbica ou lipofílica. De forma geral, a cabeça polar é constituída por um grupo fosfato e um grupo substituinte, tal como serina, colina, inositol ou etanolamina, ambos ligados ao C₃ de um glicerol. Já a cauda apolar é constituída por um ácido graxo saturado ligado ao C₁ do glicerol e um ácido graxo insaturado ligado ao C₂ da mesma molécula, fato que conhecidamente confere uma angulação à cadeia deste ácido graxo, promovendo assim maior afastamento entre as caudas hidrofóbicas adjacentes, o que reduz as forças de interação inter-moleculares, promovendo maior fluidez da membrana e portanto, a capacidade de adaptação desta (MOZAFARI et al., 2008; AKBARZADEH et al., 2013).

Assim quando em meio aquoso, esse caráter anfipático faz com que as moléculas se auto-organizem na forma de uma bicamada lipídica, com as cabeças polares voltadas para o meio aquoso e as caudas apolares voltadas umas contra as outras. Permaneceria ainda um problema de hidrofobicidade das caudas apolares ao longo do perímetro da bicamada formada, o qual a natureza resolve auto-organizando a bicamada num formato esférico, resultando na formação de uma estrutura com núcleo aquoso denominada lipossomo (Figura

11). Desta forma, estando o fármaco em solução aquosa, quando da síntese do lipossomo, ele será incorporado no núcleo aquoso do mesmo (MOZAFARI et al., 2008; AKBARZADEH et al., 2013).

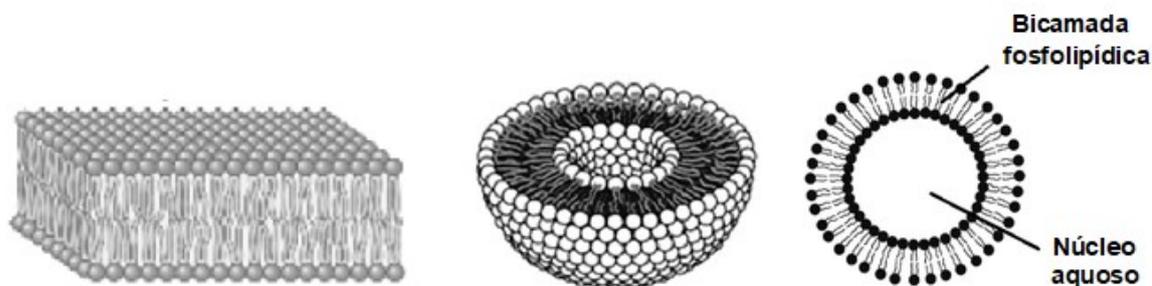


Figura 11 – Representação tridimensional da bicamada lipídica e lipossomo e corte transversal de um lipossomo. Fonte: BRANDELLI et al. (2017)

1.3.2 Classificação

Porém, existem algumas variações de lipossomos. Conforme MAHERANI et al. (2011), a classificação mais utilizada é baseada no diâmetro e número de bicamadas ou lamelas. As categorias definidas abaixo são esquematizadas na Figura 12 para melhor compreensão:

- ULVs - Vesículas Unilamelares. Contêm uma única bicamada lipídica. São subdivididas em SUVs - Vesículas Unilamelares Pequenas (diâmetro menor que 100 nm) e LUVs - Vesículas Unilamelares Grandes (diâmetro maior que 100 nm);
- MLVs - Vesículas Multilamelares. Contêm diversas bicamadas lipídicas concêntricas, separadas entre si por uma camada delgada de meio aquoso;
- MVVs - Vesículas Multivesiculares. Contêm diversas vesículas de menor diâmetro, não concêntricas, envolvidas por uma vesícula de maior diâmetro.

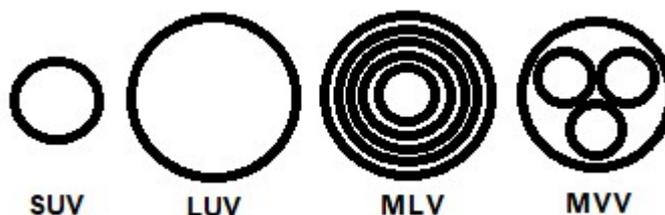


Figura 12 – Representação esquemática dos tipos de lipossomos. Fonte: BRANDELLI et al. (2017)

Por todo o exposto, pode-se definir lipossomos como sendo estruturas de tamanho nanométrico ou micrométrico, de formato esférico e com núcleo aquoso, formadas por uma ou mais bicamadas fosfolipídicas, concêntricas ou não (MOZAFARI et al., 2008; AKBARZADEH et al., 2013).

1.3.3 Métodos de preparação

Conforme MOZAFARI et al. (2008) e AKBARZADEH et al. (2013), a dimensão e morfologia das estruturas resultantes podem ser controladas através do método de preparação do lipossomo.

Segundo HUANG et al. (2014), os métodos mais comumente utilizados para a produção de lipossomos são a hidratação de filme fino, a evaporação de fase reversa, as técnicas de injeção de solvente e a diálise com detergente. De alguma maneira, todos os métodos envolvem a secagem do solvente orgânico, a dispersão do lipídio em meio aquoso e a purificação do lipossomo (AKBARZADEH et al., 2013).

O método de hidratação de filme fino é o mais amplamente utilizado para a preparação de lipossomos. Foram desenvolvidas inúmeras variações, empregando diferentes solventes orgânicos para solubilização dos lipídios, diferentes formas de evaporação do solvente e diferentes formas de re-hidratação do filme. Porém, todas as variações resultam em populações heterogêneas de MLVs. Como principais vantagens podemos ressaltar a facilidade de execução e a alta eficiência de encapsulação (RIAZ, 1996; WAGNER & VORAUER-UHL, 2011).

Alternativamente, no método de fase reversa, uma solução aquosa de peptídeo antimicrobiano é adicionada a uma solução lipídica, formando uma emulsão de água em óleo, a qual após sonicação resulta numa solução turva de micelas invertidas. Após evaporação do solvente orgânico, obtêm-se um organogel altamente viscoso, que é convertido em lipossomos após adição de água ultrapura (TEIXEIRA et al., 2008).

Existem ainda técnicas destinadas exclusivamente à redução dimensional das vesículas (downsizing), possibilitando a obtenção de lipossomos unilamelares e com tamanho mais homogêneo (HUANG et al., 2014). A sonicação é o método de redução de tamanho mais utilizado, seja para SUVs, LUVs e MLVs. Volumes maiores podem ser sonicados com sonicadores tipo banho, já suspensões que requeiram alta densidade de energia necessitam sonicadores tipo sonda (AKBARZADEH et al., 2013). MLVs que necessitem de maior redução devem empregar métodos que utilizem forças de cisalhamento ou pressão, as quais possibilitarão uma homogeneização tanto do diâmetro como do número de lamelas, tais como a homogeneização por alta pressão, a homogeneização induzida por força de cisalhamento e a microfluidização. Particularmente nesta última, a redução dimensional é obtida através da colisão entre vesículas maiores, submetidas à alta pressão na câmara de interação do microfluidizador, possibilitando assim a obtenção em grande escala de lipossomos compreendidos numa faixa entre 50-100 nm (WAGNER & VORAUER-UHL, 2011).

1.3.4 Principais vantagens na utilização

A) Aumento da estabilidade dos princípios ativos:

Como primeiro exemplo do potencial relacionado ao emprego dos lipossomos como veículos transportadores de peptídeos, pode-se mencionar o uso na prática clínica de fármacos peptídicos e proteicos, os quais de forma geral, não podem ser administrados por via oral, devido à degradação enzimática dos mesmos ao longo do trato GI, sendo usualmente administrados pela via parenteral (intravenosa, intramuscular ou subcutânea). Porém, a administração parenteral demanda elevado número de repetições, uma vez que as meia-vidas das substâncias ativas são muito curtas. Em razão disso, tem sido estudada a encapsulação em lipossomos para estabilizar e permitir a administração de medicamentos por vias alternativas, como oftálmica, nasal, pulmonar e transdérmica (TORCHILIN, 2005; ALLEN & CULLIS, 2013).

Considerando a aplicação em alimentos, primeiro ponto a ressaltar é que a encapsulação dos peptídeos antimicrobianos em lipossomos assegura a

manutenção do seu efeito na conservação dos alimentos, pois a encapsulação minimiza a interação entre os peptídeos e os componentes dos alimentos e conseqüentemente potencializa a estabilidade e eficácia dos peptídeos (MALHEIROS et al., 2010a). Havendo a presença dos microrganismos alvo no alimento, estes irão interagir com os lipossomos, promovendo a liberação do peptídeo antimicrobiano no meio. Um segundo aspecto a ressaltar é que a encapsulação evita possíveis mudanças nas propriedades organolépticas e de textura do alimento pelos peptídeos, preservando assim suas características originais. Por fim, os lipossomos possuem composição e estrutura semelhantes às membranas celulares, sendo degradados ao longo do trato GI e portanto, lipossomos eventualmente remanescentes nos alimentos podem ser ingeridos sem apresentar qualquer toxicidade para seres humanos (TORCHILIN, 2005; ALLEN & CULLIS, 2013).

Oportuno salientar, que a própria estabilidade do lipossomo e por consequência do princípio ativo a ele incorporado, pode ser aumentada pela alteração da composição de lipídios da formulação. A primeira delas é através do emprego de colesterol na composição lipídica do lipossomo. O colesterol funciona como estabilizante dos lipossomos, uma vez que promove maior ordenação das cadeias lipídicas, diminuindo a perturbação causada pela adsorção dos peptídeos antimicrobianos (EL JASTIMI & LAFLEUR, 1999; EL JASTIMI et al., 1999). A segunda maneira é pela seleção de fosfolipídios com valores de pKa adequados ao pH dos sistemas em que serão aplicados (BRANDELLI, 2012).

B) Direcionamento para os alvos terapêuticos:

Uma outra vantagem ainda relacionada ao uso clínico, é que a segunda geração de lipossomos contempla a incorporação de ligantes à superfície externa do lipossomo, tais como proteínas e anticorpos, fazendo com que ele reconheça e interaja somente com determinado tipo de células, técnica que é denominada funcionalização do lipossomo. De maneira geral, este direcionamento do lipossomo para um alvo específico, possibilita o aumento da eficiência terapêutica e ao mesmo tempo a redução da dose utilizada. No caso particular de fármacos com toxicidade elevada, como medicamentos usados em oncologia, alguns

antibióticos e antifúngicos, o direcionamento permite a administração de doses mais altas e ao mesmo tempo a redução dos efeitos colaterais observados nas terapias convencionais (BAKKER-WOUDENBERG, 2002; ALLEN & CULLIS, 2013). Oportuno ressaltar que um dos problemas mais sérios da medicina atual é o aumento da resistência bacteriana aos antibióticos. Grandes esforços de pesquisa têm sido dedicados a descobrir novas classes de fármacos, mas também muitos estudos têm alternativamente focado em melhorar os antibióticos atualmente disponíveis através de uma formulação lipossômica (DRULIS-KAWA & DOROTKIEWICZ-JACK, 2010; BSEISO et al., 2015).

Outra forma de funcionalização do lipossomo, inclusive aplicável diretamente à conservação de alimentos, diz respeito à carga elétrica da membrana lipídica, definida pela composição dos lipídios utilizados. Células bacterianas possuem carga superficial negativa, podendo assim haver repulsão eletrostática entre estas e lipossomos com carga também negativa (que por exemplo utilizem fosfatidilglicerol em sua composição), impedindo assim a ocorrência do contato entre estas estruturas e a consequente liberação do peptídeo antimicrobiano. Esse fenômeno ganha ainda mais importância, na medida em que estudos apontam que o mecanismo de interação entre lipossomos e bactérias parece envolver a fusão de membranas (MUGABE et al., 2006; COLAS et al., 2007).

C) Possibilidade de incorporação de substâncias amplamente distintas:

Lipossomos podem armazenar substâncias hidrofílicas, lipofílicas ou anfifílicas. Como visto, substâncias hidrofílicas podem ser incorporadas no núcleo aquoso do lipossomo quando da sua preparação. Caso este seja o objetivo principal deve-se dar preferência ao emprego de LUVs para esta finalidade. Por outro lado, substâncias lipofílicas podem ser incorporadas à bicamada lipídica do lipossomo por adsorção. O uso de SUVs, MLVs ou MVVs maximizam a quantidade de superfície lipídica por unidade de volume, tornando-os indicados para este objetivo. Já substâncias com caráter anfifílico, podem ser incorporadas na fase aquosa interna do lipossomo, como também podem ser imobilizadas na própria membrana lipossômica (LARIDI et al., 2003).

Lipossomos também podem armazenar substâncias com carga elétrica negativa, positiva ou neutra. Primeiramente no que diz respeito à própria substância a ser armazenada, moléculas carregadas eletricamente (seja negativa ou positivamente) exercem um efeito de repulsão umas sobre as outras, reduzindo assim sua concentração de armazenamento. Um segundo efeito diz respeito à interação entre a carga elétrica da membrana lipídica (caso não seja eletricamente neutra) e a carga elétrica da substância a ser armazenada. Independentemente se o armazenamento ocorra no núcleo aquoso ou na membrana, cargas elétricas opostas irão favorecer a incorporação e adsorção da substância a ser armazenada, enquanto cargas elétricas semelhantes irão dificultar. Por fim, há que se considerar também a interação de uma membrana carregada eletricamente com seu alvo terapêutico, esse aspecto está intimamente relacionado à funcionalização do lipossomo já descrita acima (BRANDELLI, 2012).

Pelo acima exposto, pode-se afirmar de forma bastante sintética, que o local e concentração dos compostos armazenados decorre das interações hidrofóbicas e eletrostáticas entre os peptídeos antimicrobianos e a combinação de fosfolipídios utilizados. A maioria dos peptídeos antimicrobianos, incluindo a nisina, são moléculas anfipáticas catiônicas (BRANDELLI, 2012).

D) Possibilidade de liberação controlada

Uma vez que os peptídeos antimicrobianos podem estar presentes nas fases aquosa e lipídica dos lipossomos, são esperados dois efeitos na liberação ou entrega de peptídeos antimicrobianos, um de curto prazo, composto pela liberação da substância nanoencapsulada no núcleo aquoso por ruptura do lipossomo, e um de longo prazo, composto pela dessorção do peptídeo imobilizado na membrana do lipossomo ou mesmo nas vesículas internas, se houverem, caracterizando assim uma liberação controlada. Evidentemente considerando LUVs, MVVs e MLVs de mesma dimensão, teremos tempos de liberação progressivamente mais alongados da LUV para a MLV e taxas de liberação progressivamente maiores no sentido oposto (BENECH et al., 2002).

Embora diversos estudos avaliando as vantagens do uso de peptídeos antimicrobianos nanoencapsulados tenham sido realizados, ainda não há estudos analisando quais seriam as alterações na expressão de genes associados à resistência de *L. monocytogenes* quando exposta à nisina nanoencapsulada em lipossomos de fosfatidilcolina.

1.4 Genes associados à resistência à nisina

Em consulta ao Banco de Dados Biológicos GENBANK, foi identificado o genoma *Listeria. monocytogenes* EGD-e, Acession Number NC_003210.1, sob status revisado no RefSeq, sendo o mesmo constituído por 3.055 genes. Assim, fez-se necessário previamente ao desenvolvimento deste trabalho, a realização de uma revisão da literatura científica, no intuito de identificar e descrever possíveis mecanismos de resistência de *L. monocytogenes* à nisina, assim como os genes associados ao funcionamento destes mecanismos.

1.4.1 *virR*

O regulon *virR* é constituído por 17 genes, relacionados na Tabela 6, conforme identificado pelos trabalhos de MANDIN et al. (2005), CAMEJO et al. (2009) e GRUBAUGH et al. (2018), através da expressão diferencial entre o tipo selvagem (WT) e seu mutante $\Delta virR$. Ainda conforme o trabalho de MANDIN et al. (2005), verificou-se *in silico* que os referidos genes estão organizados em 8 unidades transcricionais preditas distintas, sendo 4 operons (*virR*, *dlt*, *anr* e outro ainda não nomeado) e 4 monocístrons, (*Imo0604*, *Imo2156*, *Imo2177* e *Imo2439*). Também foi identificada a existência de uma sequência palindrômica de 16 bases (CTNACAwwwTGTNAG) dentre todos os promotores dos genes *VirR*-regulados, sugerindo que esta constitua o sítio de ligação de *VirR* na fita de DNA.

Conforme MANDIN et al. (2005), todos os monocístrons codificam proteínas de funções ainda não conhecidas. Já o operon *virR*, nome derivado de *virulence regulator*, é constituído pelo próprio gene *virR* e mais 4 genes situados a jusante (downstream) do mesmo. Os genes *Imo1744* e *Imo1743* demonstram

similaridade aos genes que codificam proteínas de funções ainda não-conhecidas.

Tabela 6 – Nomes e respectivas funções dos genes integrantes do regulon *virR*. Fonte: adaptado de MANDIN et al. (2005)

Nome do Gene	Função
operon <i>virR</i>	
<i>virR</i> (<i>lmo1745</i>)	proteína do sistema regulador bicomponente
<i>lmo1744</i>	similar à proteína de função ainda não conhecida
<i>lmo1743</i>	similar à proteína de função ainda não conhecida
<i>adeC</i> (<i>lmo1742</i>)	proteína similar à adenina deaminase do <i>Bacillus subtilis</i>
<i>virS</i> (<i>lmo1741</i>)	proteína do sistema regulador bicomponente similar à histidina quinase
operon <i>dlt</i>	
<i>dltA</i> (<i>lmo0974</i>)	proteína multifuncional - atua como enzima ativadora da D-alanina e como ligase da D-alanina ao <i>dltC</i>
<i>dltB</i> (<i>lmo0973</i>)	proteína transmembrana envolvida no efluxo da D-alanina ativada
<i>dltC</i> (<i>lmo0972</i>)	transportador proteico citoplasmático D-alanil
<i>dltD</i> (<i>lmo0971</i>)	proteína multifuncional - hidrólise do <i>DltC</i> descarregado, facilitação da ligação da D-alanina ao <i>DltC</i> e D-alaninação dos LTAs
operon <i>anr</i>	
<i>anrA</i> (<i>lmo2115</i>)	transportador ABC (permease), substrato ainda não conhecido
<i>anrB</i> (<i>lmo2114</i>)	transportador ABC (proteína ligada à ATP), substrato ainda não conhecido
operon <i>sl</i> nome	
<i>lmo1696</i>	proteína similar à <i>VanZ</i>
<i>mprF</i> (<i>lmo1695</i>)	proteína similar à <i>MprF</i> do <i>Staphylococcus aureus</i>
monocistrons	
<i>lmo0604</i>	proteína de função ainda não conhecida
<i>lmo2156</i>	proteína de função ainda não conhecida
<i>lmo2177</i>	proteína de função ainda não conhecida
<i>lmo2439</i>	proteína de função ainda não conhecida

O terceiro gene a jusante de *virR*, *adeC* mostra 67% de homologia com o gene de mesmo nome, adenina deaminase, do *Bacillus subtilis*, relacionado ao uso da adenina como fonte de carbono e nitrogênio. Por fim, o último gene do operon codifica uma proteína com forte homologia à histidina quinase, o qual é designado por *virS*.

Conforme MANDIN et al. (2005), repetindo a abordagem transcriptômica entre WT e um mutante $\Delta virS$, foi encontrada a expressão diferencial dos mesmos 12 genes situados fora do operon *virR*, uma vez que *virR* e *virS* são membros de um mesmo sistema regulador bicomponente. Porém, foi encontrada ainda a expressão diferencial de outros 108 genes, indiretamente regulados por *VirS*, dos quais 79 tiveram sua expressão aumentada (up-regulated) e 29 tiveram sua

expressão reduzida (down-regulated). Aproximadamente um terço destes genes (29%) codificam proteínas de função ainda desconhecida. Os demais codificam proteínas conhecidas ou preditas por estarem envolvidas no metabolismo (30%), regulação (13%), transporte (14%), resposta ao estresse (8%) e virulência (1%), dentre outras funções (5%).

O operon *dlt* é constituído pelos genes *dltA*, *dltB*, *dltC* e *dltD*, sendo responsável por catalisar a D-alanilação dos ácidos teicóicos (TAs) e lipoteicóicos (LTAs) da parede celular (MANDIN et al., 2005). Segundo DEBABOV et al. (2000), DltC é um transportador protéico citoplasmático D-alanil. DltA atua como enzima ativadora da D-alanina e como ligase da D-alanina ao DltC. DltB é uma proteína transmembrana envolvida no efluxo da D-alanina ativada e por fim, DltD é uma proteína multifuncional associada à membrana, responsável pela hidrólise do DltC descarregado, facilitação da ligação da D-alanina ao DltC e D-alanilação dos TAs e LTAs.

Outro operon, ainda sem nome atribuído, é constituído pelos genes *Imo1696* e *Imo1695*, que codificam respectivamente uma proteína contendo um domínio VanZ e uma proteína com mais de 38% de semelhança ao fator MprF (*multiple peptide resistance factor*) do *Staphylococcus aureus*. Este fator é responsável pela L-lisinilação (ligação covalente de um resíduo de L-lisina) do fosfatidilglicerol, presente na membrana celular bacteriana (MANDIN et al., 2005; KANG et al., 2015).

Por fim, conforme MANDIN et al. (2005), o operon *anr* é constituído pelos genes *Imo2114* e *Imo2115*, cujas proteínas mostram elevada homologia com uma proteína ligada ao ATP e uma permease, ambas integrantes de um sistema transportador ABC, cujo substrato ainda não é conhecido. Porém, segundo KANG et al. (2015), acredita-se que o operon seja responsável pelo efluxo de compostos tóxicos por bombeamento.

Visando compreender melhor a contribuição de cada um dos mecanismos, KANG et al. (2015), compararam a sobrevivência de 3 tipos de mutantes ($\Delta dltA$, $\Delta mprF$ e $\Delta anrAB$) em relação ao WT, sob condições de estresse antimicrobiano. Nenhum efeito significativo da deleção de *anrAB* sobre a sensibilidade aos CAMPs foi observado. Porém, tanto o operon *dlt* como o gene *mprF* foram

responsáveis por modificações na membrana celular, sendo que a D-alanilação dos TAs facilitada pelo operon *dlt* aparentou constituir o principal mecanismo de resistência contra estes peptídeos. Estes dados levaram KANG et al. (2015), a propor um modelo de resistência aos CAMPs mediado por Vir-R, o qual é apresentado na Figura 13.

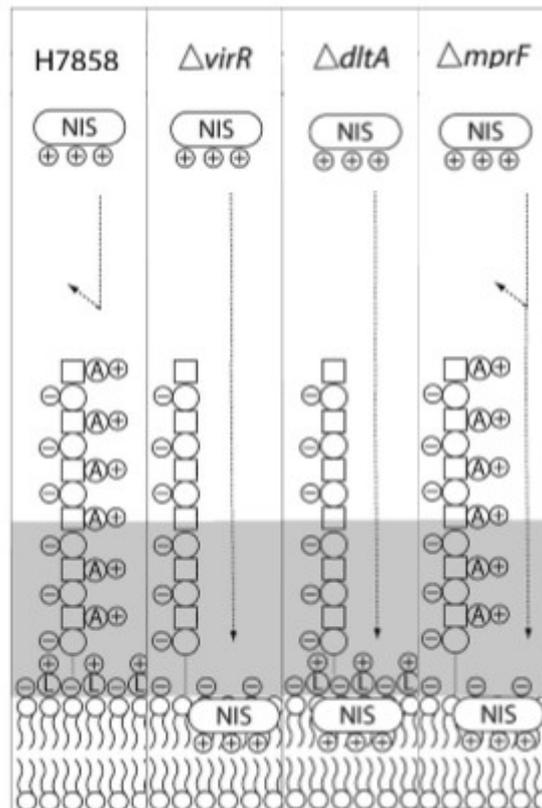


Figura 13 – Modelo de resistência aos CAMPs. Fonte: Adaptado de KANG et al. (2015)

No modelo em questão, a parede celular está representada em cinza e a membrana celular representada abaixo da área cinza. A D-alanilação dos ácidos lipoteicóicos da parede celular mediada pelo operon *dlt* e a L-lisilação dos fosfolípidios da membrana celular mediada pelo gene *mprF* estão respectivamente representadas pelas letras A e L na Figura 13. Observa-se que na cepa tipo WT ambos mecanismos estão presentes, anulando as cargas negativas do envelope celular e promovendo a repulsão das moléculas de nisina, as quais são catiônicas. Adversamente, no mutante $\Delta virR$, ambos mecanismos se encontram ausentes, permitindo a aproximação e atuação do CAMP sobre a membrana celular. Já no mutante $\Delta dltA$, apenas o mecanismo de D-alanilação

dos ácidos lipoteicóicos da parede celular está ausente, porém, o efeito sobre as moléculas de nisina é aproximadamente idêntico ao do mutante $\Delta virR$. Por fim, no mutante $\Delta mprF$, apenas a L-lisinilação dos fosfolipídios da membrana celular está ausente, promovendo portanto, uma repulsão parcial das moléculas de nisina. Este modelo abrange os dois principais mecanismos de modificação da parede celular, como também representa a maior contribuição do operon *dlt*.

Vale ressaltar que ABACHIN et al. (2002), já haviam realizado experimentos com um mutante produzido através da inativação do primeiro gene do operon *dlt*, obtendo os seguintes resultados:

- O cultivo em meio BHI apresentou morfologia e taxa de crescimento idênticas ao WT, porém, exibiu susceptibilidade aumentada à nisina. A concentração inibitória mínima (MIC) obtida na cepa $\Delta dltA$ foi 4.096 vezes menor que na cepa WT;
- Além disso, *in vitro*, a adesão as diferentes linhagens celulares foi fortemente impactada na cepa $\Delta dltA$, embora as concentrações de proteínas de superfície relacionadas à virulência (ActA, InIA e InIB) não estivessem alteradas;
- *In vivo*, a cepa $\Delta dltA$ demonstrou severa redução na virulência da infecção em ratos;
- Por fim, após análise dos LTAs, foi constatada a substituição de 21% dos resíduos de glicerofosfato dos LTAs por resíduos de D-alanina no WT, enquanto no mutante $\Delta dltA$ como esperado não houve substituição alguma.

Como visto, o operon *dlt* tem como função a D-alanilação dos LTAs da parede celular, sendo este o principal mecanismo de redução e até mesmo inversão de polaridade do envelope bacteriano. Assim, pode-se compreender que a supressão de *dlt* resultará em forte susceptibilidade à nisina (já que haverá atração eletrostática entre elas) e forte redução da capacidade de adesão. Por consequência também haverá redução na virulência, já que haverá repulsão eletrostática em relação às células eucarióticas do hospedeiro (possuem potencial de membrana negativo).

Percebe-se por todo acima exposto, que constitui fato amplamente demonstrado pela literatura científica, a modulação da resistência de *L.*

monocytogenes aos CAMPs, através de modificações na membrana celular, reguladas pelo nível de expressão dos genes *dltABCD* e *mprF*. Isso explica inclusive porque a maioria das publicações que tenham objetivo de estudar o aumento da resistência de *L. monocytogenes* à nisina, se limitam a monitorar a expressão destes genes. Também constitui fato igualmente demonstrado, a regulação do nível de expressão dos referidos genes pelo sistema de resposta regulatória bicomponente *virR/virS*.

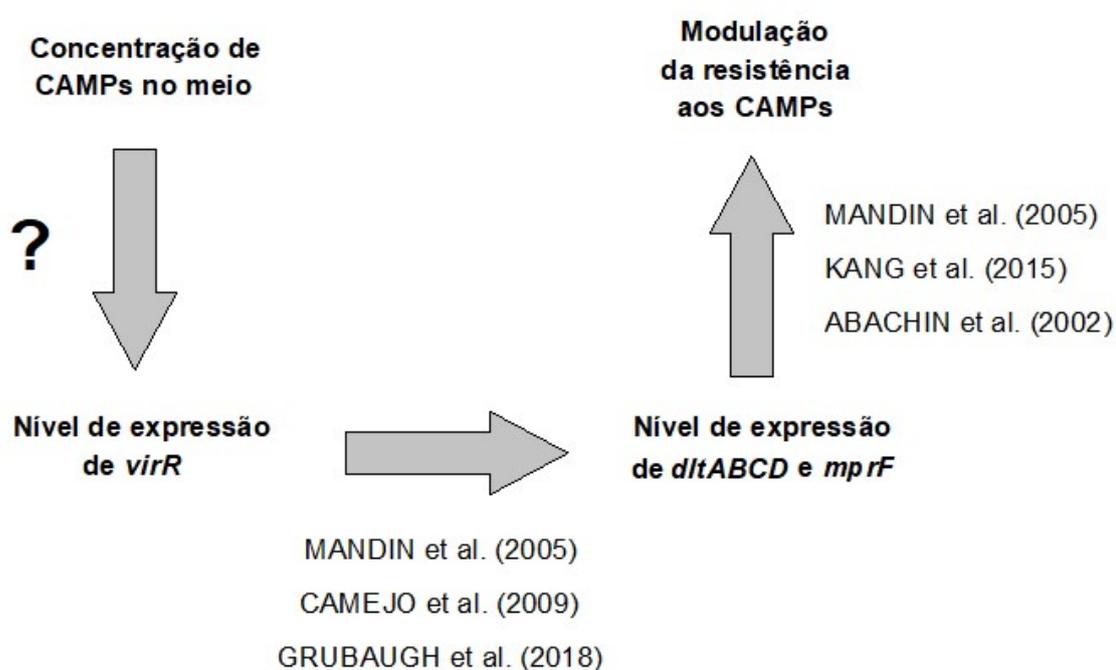


Figura 14 – Síntese do raciocínio construído. Fonte: O autor

Considerando-se que *virS* está situado no mesmo operon de *virR* e a jusante deste, ou seja, *virS* só será expresso se *virR* também for, torna-se perfeitamente viável o estabelecimento de uma correlação direta entre o nível de expressão de *virR* e a modulação da resistência de *L. monocytogenes* aos CAMPs. Com isso, o último aspecto pendente de comprovação experimental seria se o aumento da concentração do peptídeo no meio, é capaz de alterar o nível de expressão de *virR*. A síntese deste raciocínio pode ser facilmente visualizada no fluxograma da Figura 14.

Para este propósito, KANG et al. (2015), utilizaram uma fusão transcricional do promotor do operon *dlt* com um GUS gene-reporter. Um GUS gene-reporter é

um sistema particularmente utilizado em biologia molecular de plantas e microbiologia, em que a sequência que codifica a síntese de β -glicuronidase, uma enzima da bactéria *Escherichia coli*, é inserida junto ao promotor do gene cuja expressão quer se monitorar. Esta enzima quando incubada em alguns meios incolores e substratos não fluorescentes pode transformá-los em coloridos e fluorescentes, permitindo uma avaliação quantitativa através da intensidade da cor ou fluorescência. Conforme se observa na Figura 15, a atividade de GUS não foi detectada na ausência de VirR ou VirS ($\Delta virR$ ou $\Delta virS$), fato que era esperado. Para o WT, foi observado apenas um ligeiro aumento no nível de atividade de GUS quando na presença de 0,10 $\mu\text{g/mL}$ de nisina, comparativamente à condição sem nisina. Por fim, após incubação por 12 h a 7 °C, houve um aumento significativo no nível de atividade em ambas condições (sem nisina e com 0,10 $\mu\text{g/mL}$ de nisina), permanecendo a diferença anteriormente existente dos níveis de atividade entre estas duas condições experimentais.

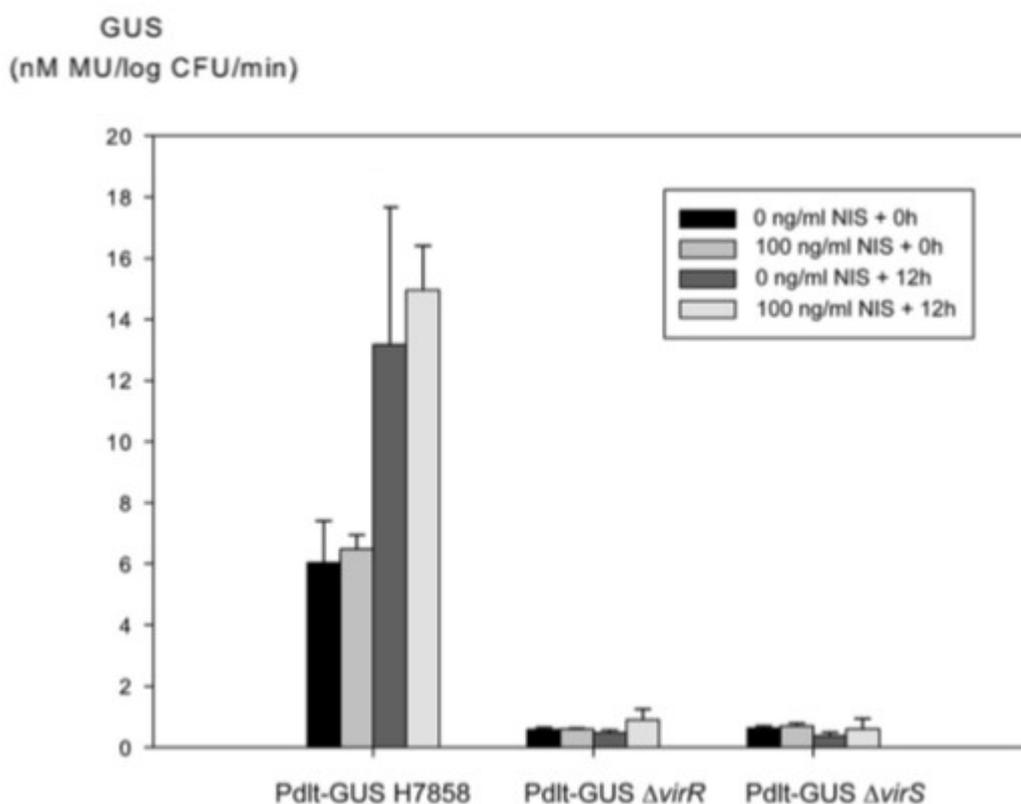


Figura 15 – Níveis de atividade do GUS gene reporter acoplado ao promotor do operon *dlt*.

Fonte: Adaptado de KANG et al. (2015)

Embora constitua evidência muito frágil, KANG et al. (2015) interpretam estes resultados como sugestivos de que a presença de nisina não é capaz de induzir a superexpressão do operon *dlt*.

Em artigo recente, GRUBAUGH et al. (2018) realizaram a medida da expressão do gene *dltD*, de cepas WT e $\Delta virR$, nas concentrações de 0,1 e 1,0 $\mu\text{g/mL}$ de nisina, utilizando qRT-PCR. Em consonância com o trabalho de KANG et al. (2015), a expressão do operon *dlt* não aumenta na presença de 0,1 $\mu\text{g/mL}$ de nisina. Porém, na concentração de 1,0 $\mu\text{g/mL}$ a expressão de *dltD* aumenta 100%, conforme pode ser observado na Figura 16. Estes dados de forma adversa ao trabalho de KANG et al. (2015), configuram um primeiro indício que o nível de expressão dos genes VirR controlados respondem ao aumento da concentração de nisina.

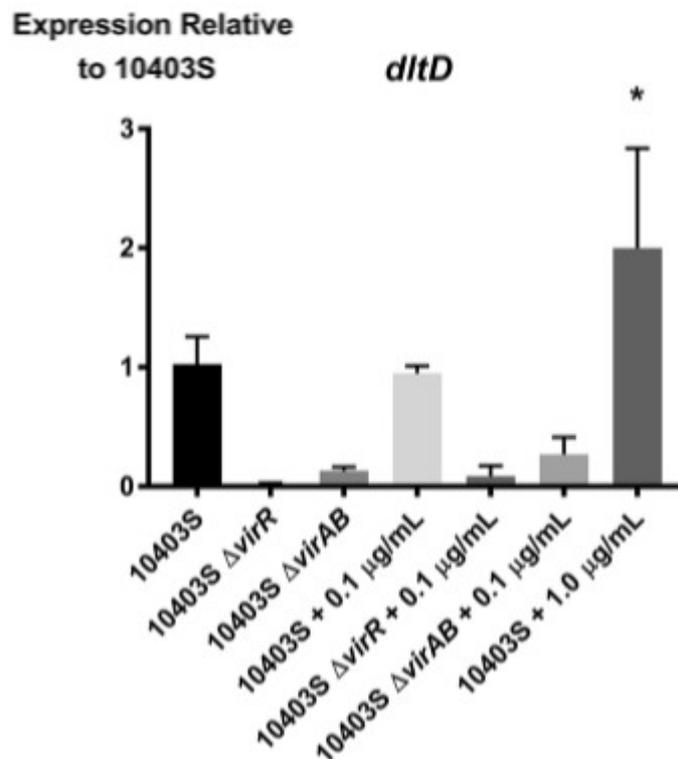


Figura 16 – Nível de expressão relativa do gene *dltD*, sob diferentes concentrações de nisina, utilizando a linhagem 10403S de *Listeria monocytogenes*. Fonte: GRUBAUGH et al. (2018)

GRUBAUGH et al. (2018) reconhecem que embora tenha sido amplamente demonstrado a determinação do regulon *virR* sobre a resistência aos CAMPs tal como a nisina, ainda há uma deficiência de evidências ligando a utilização da nisina à superexpressão de *virR*.

Por todo exposto, *virR* terá sua expressão diferencial monitorada no presente trabalho com objetivo de verificar se o uso de nisina na forma nanoencapsulada apresenta algum benefício ou desvantagem à redução da resistência de *L. monocytogenes* a este CAMP. Como um objetivo secundário, também será verificado se há variação na expressão de *virR* ao empregarmos diferentes concentrações de nisina livre.

1.4.2 *prfA*

Conforme SCORTTI et al. (2007), o regulon *prfA* (positive regulatory factor A) é constituído por 11 genes organizados numa ilha de patogenicidade denominada LIPI-1, o operon *inlAB*, o monocístron *inlC* e o monocístron *hpt*. CAMEJO et al. (2009) relacionam 12 genes positivamente regulados por *prfA*, identificados através da análise transcricional do regulon *prfA*, dentre os quais 10 são coincidentes com os genes identificados por SCORTTI et al. (2007).

Ainda segundo SCORTTI et al. (2007), LIPI-1 é composta por *plcA* e *plcB* que codificam a síntese de fosfolipases C, *hly* que codifica a hemolisina listeriolisina O, *mpl* que codifica uma metaloprotease envolvida na maturação extracelular do produto de *plcB*, *actA* que codifica o fator de nucleação de actina, *orfX*, além de *prfA* que codifica a síntese da própria proteína reguladora. Até recentemente, considerava-se que *Imo0206* (*orfX*) codificava uma proteína hipotética, conforme ainda consta no NCBI. Porém, PROKOP et al. (2017), demonstram em seu trabalho que a produção de OrfX contribui para limitar a resposta imune inata no hospedeiro através da depressão da resposta oxidativa dos macrófagos.

O operon *inlAB*, como descrito por SCORTTI et al. (2007), codifica as internalinas A e B, com função de induzir a internalização das bactérias em células epiteliais não-fagocíticas do hospedeiro, conforme já descrito

anteriormente. O monocístron *inlC* codifica uma internalina pequena cujo papel na patogênese ainda não foi estabelecido. Por fim, o monocístron *hpt*, último componente do regulon *prfA* a ser descoberto, codifica um transportador fosfato-hexose requerido para o rápido crescimento bacteriano no citosol da célula hospedeira.

Percebe-se assim que *prfA* é um regulon de virulência de *L. monocytogenes*, através do qual cada um dos passos da infecção intracelular, tal como invasão da célula hospedeira, escape fagossomal, replicação citosólica e disseminação célula à célula, são mediados por um de seus transcritos.

As unidades transcricionais descritas podem ser visualizadas na Figura 17, onde os genes apontando para direita encontram-se na fita positiva, os promotores conhecidos estão indicados por P e os transcritos por linhas tracejadas.

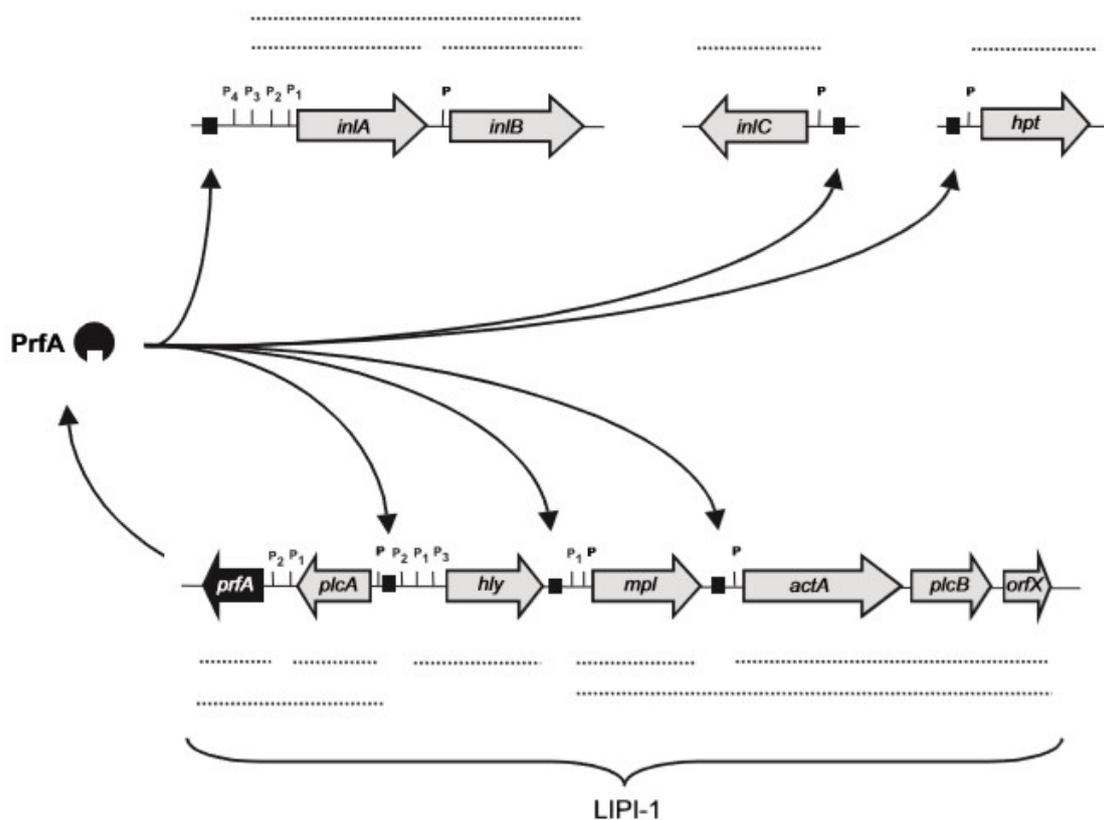


Figura 17 – Representação do regulon *prfA*. Fonte: SCORTTI et al. (2007)

A partir da análise *in silico* dos genes, SCORTTI et al. (2007) identificaram uma sequência consensual formada por 14 bases (TTAACANNTGTAA), a qual

provavelmente constitui o sítio de ligação de PrfA na fita de DNA. Estas PrfA boxes também estão representadas na Figura 17 através de quadrados pretos. Realizando uma busca pela sequência consensual no genoma de *L. monocytogenes* EGD-e, com uma tolerância de até 2 erros, foram encontrados cerca de 300 genes, revelando um enorme potencial ainda não conhecido. Na mesma direção, MILOHANIC et al. (2003) identificaram em seu trabalho, cerca de 50 genes indiretamente up-regulados por PrfA e também associados com sequências promotoras consensuais dependentes de *sigB*.

Segundo SCORTTI et al. (2007), a fim de garantir a máxima expressão do regulon *prfA* no hospedeiro e sua repressão no meio ambiente, *L. monocytogenes* utiliza diversos mecanismos de regulação, integrados à sinalização derivada da própria bactéria e do meio-ambiente, dentre eles:

A) Modificação alostérica de PrfA

Segundo REZONI et al. (1999), o principal mecanismo pelo qual PrfA regula a expressão dos genes de virulência é a modificação alostérica do seu sítio de ligação ao DNA através da interação com um cofator, o qual pode ser constituído por diferentes sinais químicos específicos do compartimento hospedeiro.

Além desta via de ativação, também foram identificadas duas vias de regulação negativa adicionais. ERMOLAEVA et al. (2004), mencionam em seu trabalho uma substância autorepressora, a qual parece ser uma pequena molécula hidrofóbica, entregue durante a fase de crescimento exponencial do microrganismo, a qual interfere no mecanismo de ativação alostérica de PrfA e BREHM et al. (1999), observaram que quando *L. monocytogenes* cresce em carboidratos fermentáveis, tal como glicose, frutose, manose ou β -glicosídeos, também ocorre inibição da ativação alostérica de PrfA, prevenindo assim a síntese desnecessária de fatores de virulência quando supostamente o microrganismo se encontra no ambiente.

B) Alteração na concentração de PrfA

Como pode ser deduzido a partir da observação da Figura 17 a concentração de PrfA é definida por dois transcritos: monocistronicamente pelo gene *prfA* e bicistronicamente em conjunto com o gene *plcA* situado imediatamente a montante (upstream) de *prfA*. Além disso, *prfA* possui dois promotores. LEIMEISTER-WACHTER et al. (1992), descrevem que P_{1prfA} é um promotor vegetativo, dependente de σ_A , direcionado ao baixo nível de síntese de mRNAs de *prfA* durante o crescimento bacteriano normal. A região 5' não traduzível deste transcrito (UTR), forma uma estrutura secundária, que atua como um termosensor. Para temperaturas inferiores a 30 °C, a estrutura secundária cobre o sítio de ligação ao ribossomo, impedindo a tradução. Porém, a 37 °C a estrutura secundária se desfaz e a síntese de PrfA ocorre normalmente. De fundamental importância ressaltar que este mecanismo evita a síntese de fatores de virulência no ambiente, mas ao mesmo tempo permite a síntese rápida de PrfA quando o microrganismo invade o hospedeiro, uma vez que o citosol da célula bacteriana já se encontra repleto de mRNA. P_{2prfA} é situado a jusante de P_{1prfA} e regulado por α_A e pelo fator responsivo ao estresse σ_B . A dependência parcial de σ_B pode ser observada por exemplo através da indução da expressão de fatores de virulência *prfA* regulados, tais como *hly* e *actA*, sob condições de exposição de *L. monocytogenes* a agentes de estresse tais como temperatura elevada, agentes oxidantes ou privação de nutrientes.

Embora esses níveis basais sejam suficientes para a expressão dos genes hipersensíveis mencionados, não é para os demais genes do regulon. Conforme MENGAUD et al. (1991), somente com o início da expressão bicistônica de *plcA-prfA*, que depende da presença de PrfA, ocorre a amplificação da quantidade de PrfA no citosol em até 10X, necessária à expressão dos demais genes. Vale ressaltar ainda que PrfA é uma proteína dimérica, assim sua concentração no citosol será metade da concentração de transcritos apenas.

C) Diferença na atividade de PrfA

Conforme VEGA et al. (2004), promotores como *Phly* e *PplcA*, os quais possuem exatamente a sequência consensual do sítio de ligação de PrfA, são

mais eficientemente ativados do que aqueles com alguma substituição de nucleotídeos, tais como *Pmpl*, *PactA*, *Phpt* e *PinIC* (1 mismatch) ou *PinIA* (2 mismatches). Outro aspecto é o fato dos promotores de cada gene possuírem diferentes afinidades pela RNA polimerase. Desta forma, uma mesma concentração de PrfA no citosol não obrigatoriamente produzirá a mesma quantidade de transcritos para cada gene PrfA dependente. Vale ressaltar ainda que genes como *hly*, *mpl* e *inIA* possuem a presença de promotores adicionais PrfA-independentes, conforme se observa na Figura 17, cujos mecanismos ainda encontram-se em estudo (SCORTTI et al., 2007).

Em razão dos mecanismos de regulação descritos acima, em particular o fato da região UTR do transcrito de *prfA* formar uma estrutura secundária que atua como um termosensor, não ocorrerá a síntese de PrfA fora do hospedeiro e por consequência a expressão dos fatores de virulência. Porém, adversamente, a transcrição de *prfA* pode acontecer fora do hospedeiro sem nenhum impedimento, levando a um acúmulo dos transcritos no citosol bacteriano, o que pode resultar em um aumento considerável da virulência na fase inicial da infecção no hospedeiro.

Por todo exposto, embora não seja esperado nenhum efeito de *prfA* sobre a resistência de *L. monocytogenes* à nisina, sua expressão diferencial será monitorada no presente trabalho, como critério de segunda ordem, na verificação se o uso de nisina na forma nanoencapsulada apresenta algum benefício ou desvantagem quanto à redução da virulência.

1.4.3 *sigB*

Além de constituir um dos fatores necessários à transcrição do DNA pela RNA polimerase, conforme SMITH et al. (2013), o fator sigma B (SigB), também é responsável pela resposta adaptativa de tolerância ao ácido (ATR).

Segundo BONNET & MONTVILLE (2005), a ATR é definida como a resistência adquirida às condições ácidas letais, após uma pré exposição às condições ácidas mais brandas. BONNET & MONTVILLE (2005), demonstraram

que células de *L. monocytogenes* pré-expostas ao ácido láctico, pH 5,5 em meio TSBY por 1 h, denominadas ATR+, foram sensivelmente mais resistentes à nova exposição subsequente em pH 3,5 do que células expostas diretamente a esta condição, denominadas células controle ou ATR-, conforme demonstra a Figura 18, evidenciando assim a ocorrência da resposta adaptativa de tolerância ao ácido.

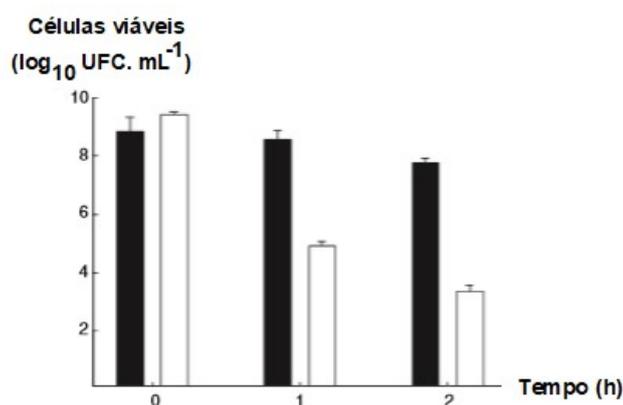


Figura 18 – Viabilidade após exposição de *Listeria monocytogenes* ATR+ (preto) e ATR- (branco) ao ácido láctico. Fonte: BONNET & MONTVILLE (2005)

Interessante ressaltar que BONNET & MONTVILLE (2005), repetiram o mesmo experimento com ácido clorídrico (principal componente do suco gástrico), não tendo observado nenhuma diferença estatística entre a quantidade de células viáveis ATR+ e ATR-, mesmo após 3 h de incubação no pH 3,5, como também não tendo ocorrido qualquer decaimento da quantidade de células viáveis ao longo do tempo, conforme demonstra a Figura 19. Este resultado sugere que *L. monocytogenes* é tão bem adaptada à sobrevivência no ácido clorídrico, que sequer houve decaimento na quantidade de células viáveis ATR- e desta forma tornou-se indiferente o microrganismo expressar ou não a resposta adaptativa de tolerância ao ácido. Conforme (ITA & HUTKINS, 1990), como as membranas celulares são eletricamente carregadas, a entrada de ácido na célula ocorre primariamente na forma não carregada. Uma vez que ácidos fortes, como o ácido clorídrico já se encontram previamente com quase todas as moléculas ionizadas, ácidos fracos como o ácido láctico, tendem a penetrar nas células mais rapidamente que ácidos fortes.

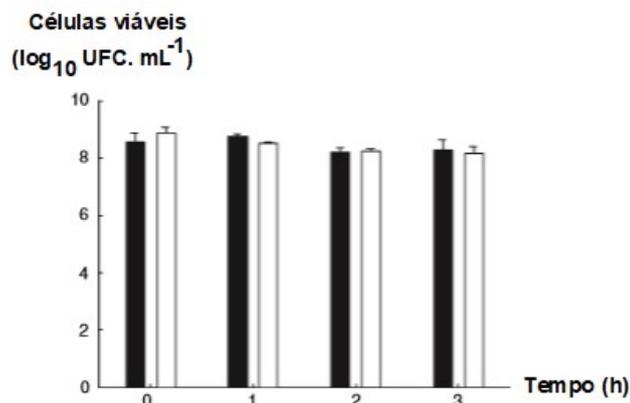


Figura 19 – Viabilidade após exposição de *Listeria monocytogenes* ATR+ (preto) e ATR- (branco) ao ácido clorídrico. Fonte: BONNET & MONTVILLE (2005)

BONNET & MONTVILLE (2005), ainda repetiram o experimento com ácido acético, novamente não sendo observada nenhuma diferença estatística entre a quantidade de células viáveis ATR+ e ATR-, porém, de forma adversa, após 1 h de incubação, ambas quantidades de células já haviam se reduzido drasticamente, sugerindo a incapacidade de *L. monocytogenes* expressar ATR para o ácido acético (os dados experimentais não foram apresentados no artigo). Uma vez que a constante de dissociação do ácido acético é inclusive menor que do ácido láctico ITA & HUTKINS (1990), sugerem que o ácido acético deva apresentar alta toxicidade para *L. monocytogenes*, afetando sua capacidade de induzir ATR. Assim, fica demonstrada que a ativação da ATR é muito vinculada ao tipo de ácido presente no meio.

Além disso, O'DRISCOLL et al. (1996) e SMITH et al. (2013), demonstraram que células de fase estacionária são naturalmente resistentes ao estresse ácido, sem a necessidade de uma pré-exposição às condições ácidas mais brandas, sugerindo portanto, que a ATR seja automaticamente ativado na fase estacionária.

WIEDMANN et al. (1998), compararam a taxa de sobrevivência de células da fase estacionária entre um mutante $\Delta sigB$ e seu respectivo WT, ambos sem prévia exposição e expostos ao pH 2,5 por 2 h, obtendo uma taxa de sobrevivência cerca de 1.000 vezes menor para o mutante $\Delta sigB$, conforme se observa na Figura 20.

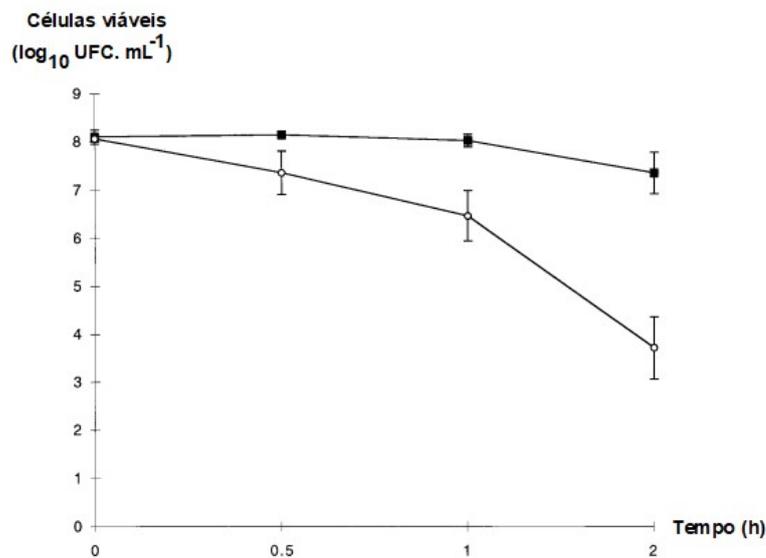


Figura 20 – Viabilidade após exposição de *Listeria monocytogenes* WT(preto) e $\Delta sigB$ (branco) ao pH 2,5. Fonte: WIEDMANN et al. (1998)

De maneira semelhante, RAENGPRADUB et al. (2008), compararam a redução na viabilidade, isto é a viabilidade final menos a viabilidade inicial em módulo, de células na fase de crescimento exponencial (esquerda) e na fase estacionária (direita), entre um mutante $\Delta sigB$ e seu respectivo WT, expostos ao pH 2,5 em meio BHI, obtendo uma redução cerca de 10.000 vezes maior para o mutante $\Delta sigB$ na fase de crescimento exponencial e 1.000 vezes maior na fase estacionária do que a redução para o WT, conforme se observa na Figura 21. Ambos os trabalhos corroboram portanto, com a demonstração de que a indução de ATR é regulada por *sigB*.

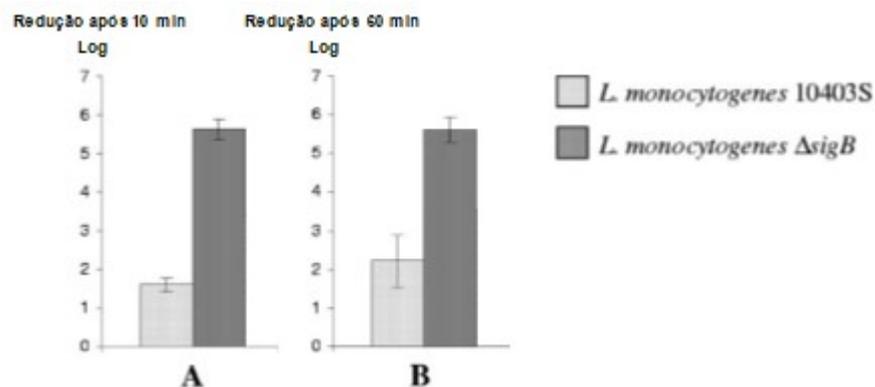


Figura 21 – Redução de viabilidade após exposição de *Listeria monocytogenes* ao pH 2,5. Fonte: Adaptado de RAENGPRADUB et al. (2008)

Conforme SMITH et al. (2013), *sigB* funciona como um regulador central de respostas ao estresse em *L. monocytogenes*, havendo vários estudos demonstrando que a ATR pode fornecer proteção cruzada contra o calor, sal, sais biliares, etanol e estresse oxidativo, bem como contra a ação de bacteriocinas (BONNET & MONTVILLE, 2005; O'DRISCOLL et al., 1996).

Para testar o aumento da resistência cruzada contra as bacteriocinas, BONNET & MONTVILLE (2005), inocularam células ATR+ e ATR- de *L. monocytogenes*, em meio de cultura fermentado com *Lactococcus lactis* produtores de nisina. Três dias após a inoculação, o número de células ATR+, foi 100 vezes mais alto que o número de células ATR-, conforme demonstrado na Figura 22. Para uma avaliação da viabilidade em longo prazo, verificou-se que 30 dias após a inoculação, a recuperação de *L. monocytogenes* foi possível em 4 das 5 amostras ATR+, contra nenhuma das 5 amostras ATR-, sugerindo que ATR confere resistência cruzada à nisina inclusive por tempo superior a 30 dias.

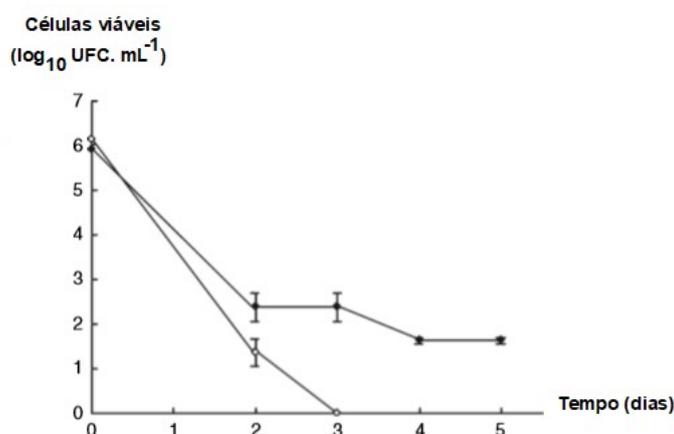


Figura 22 – Viabilidade após co-cultivo de *Listeria monocytogenes* ATR+ (preto) e ATR- (branco) com *Lactococcus lactis* produtores de nisina. Fonte: BONNET & MONTVILLE (2005)

Resultados muito semelhantes já haviam sido demonstrados por VAN SCHAİK et al. (1999), conforme se observa na Figura 23, onde células ATR+ (preto) e ATR- (branco), foram cultivadas em meio TSBYE com pH 7,0 (quadrados) e pH 5,5 (círculos), contendo 100 UI/mL de nisina (esquerda) e 200 UI/mL de nisina (direita). Em todas as condições experimentais observa-se que as

células ATR+ apresentaram percentuais de sobrevivência muito superiores ao das células controle.

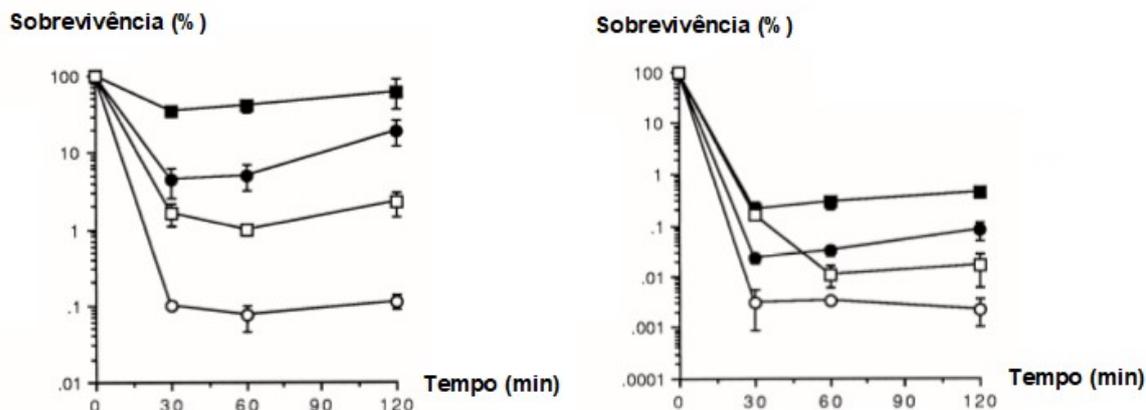


Figura 23 – % de sobrevivência após exposição de *Listeria monocytogenes* ATR+ (preto) e ATR- (branco) à nisina. Fonte: VAN SCHAİK et al. (1999)

Por fim, BEGLEY et al. (2006), compararam as taxas de crescimento de um mutante $\Delta sigB$ com o WT, primeiramente em meio ágar BHI a 37 °C, não tendo obtido nenhuma diferença entre ambos, sugerindo que *sigB* não é requerido para o crescimento em condições fisiológicas normais. Porém, ao repetir o experimento em meio BHI com 300 $\mu\text{g/mL}$ de nisina, conforme demonstra a Figura 24, embora a população de células viáveis do WT tenha se reduzido cerca de 5 ordens de grandeza em menos de 1 h após a inoculação, permaneceu estável com ligeira tendência de crescimento mesmo após 6 h. Já a população de células viáveis do tipo $\Delta sigB$ foi completamente extinta cerca de 1 h após a inoculação, sugerindo uma importante participação de *sigB* na tolerância à nisina.

Percebe-se por todo acima exposto, constituir fato amplamente demonstrado pela literatura científica, a existência em *L. monocytogenes* de um mecanismo de resposta adaptativa de tolerância ao ácido, o qual consiste no desenvolvimento de resistência ao pH letal após exposição prévia a um pH não-letal.

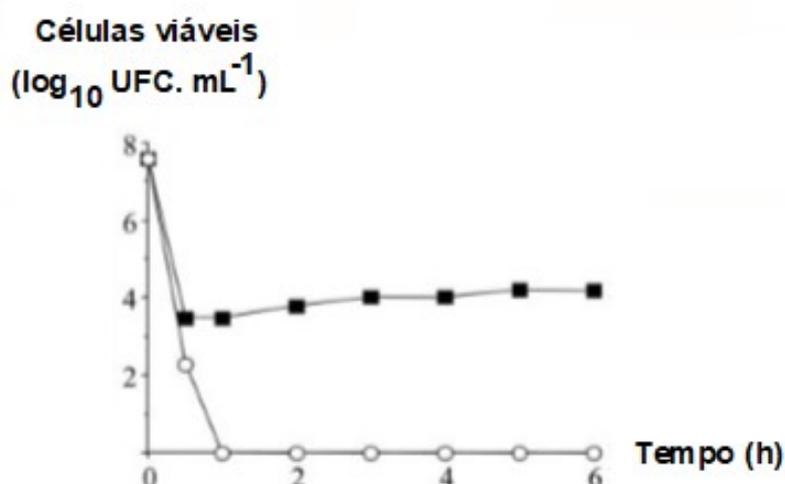


Figura 24 – Viabilidade após cultivo de *Listeria monocytogenes* em meio com nisina. WT (preto) e $\Delta sigB$ (branco). Fonte: BEGLEY et al. (2006)

Também constituem fatos igualmente demonstrados, a mediação desse mecanismo pelo gene regulador *sigB* e a modulação da resistência de *L. monocytogenes* à nisina (CAMP), como consequência das alterações decorrentes da ATR. Assim, torna-se perfeitamente viável o estabelecimento de uma correlação direta entre o nível de expressão de *sigB* e a modulação da resistência de *L. monocytogenes* aos CAMPs. Por fim, mesmo que intuitivamente não seja esperada tal correlação, devemos nos questionar se a concentração de nisina no meio seria capaz de modular o nível de expressão de *sigB*. Porém, não foi identificado nenhum artigo experimental nesse sentido nas bases de dados pesquisadas. A síntese deste raciocínio pode ser facilmente visualizada através do fluxograma da Figura 25.

Outro questionamento inevitável é quais seriam os mecanismos responsáveis pela resistência cruzada de *L. monocytogenes* aos CAMPs? No intuito de identificar tais mecanismos VAN SCHAİK et al. (1999), estudaram por meio de cromatografia gasosa a ocorrência de possíveis alterações na membrana celular de células ATR+, tendo encontrado apenas uma modificação na composição dos ácidos graxos saturados, com aumento do percentual de C14:0 e C16:0 e redução do percentual de C18:0, conforme demonstrado na Figura 26, fato que pode ter implicações na fluidez da membrana celular.

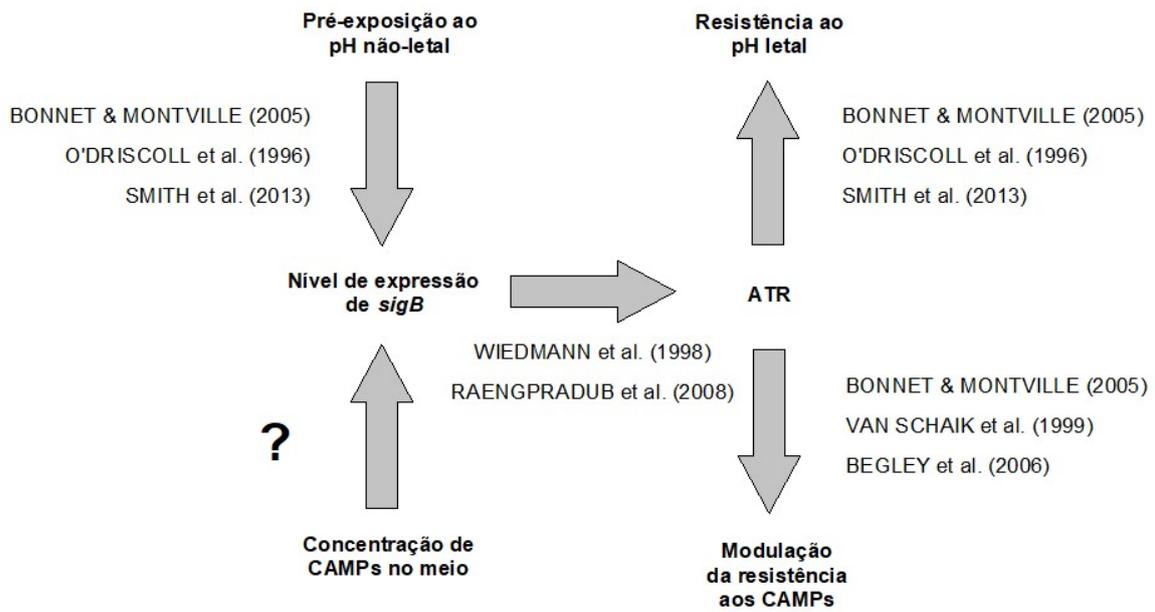


Figura 25 – Síntese do raciocínio construído. Fonte: O autor

Conforme VAN SCHAİK et al. (1999), esta alteração já havia sido identificada em trabalhos anteriores com células mutantes resistentes à nisina. Porém, tais alterações isoladamente não são suficientes para explicar o aumento da resistência.

Porcentagem do Total

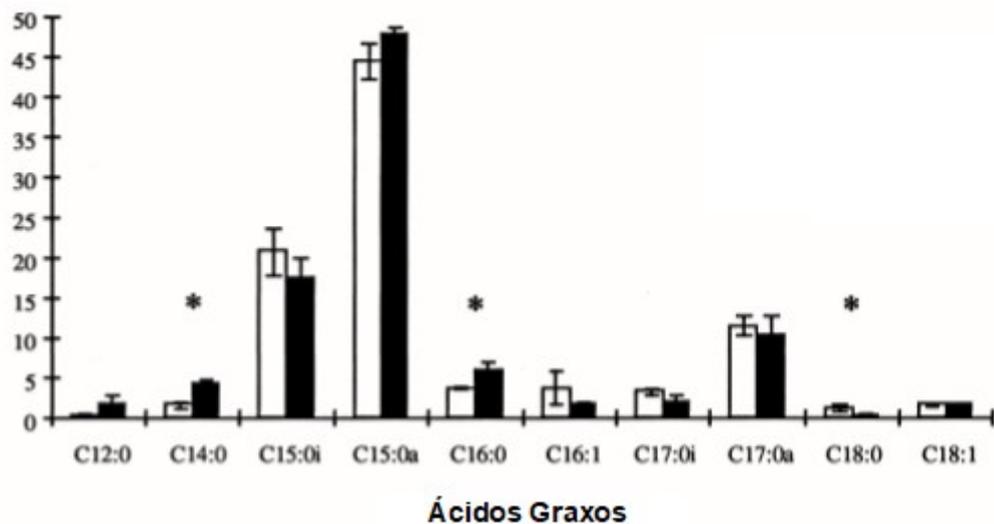


Figura 26 – Composição de ácidos graxos saturados na membrana celular de *Listeria monocytogenes* ATR+ (preto) e ATR- (branco). Fonte: VAN SCHAİK et al. (1999)

BONNET et al. (2006), identificaram que células ATP+ submetidas à nisina, demonstram menor diferença de potencial elétrico e diferença de pH transmembrana, assim como um nível de ATP intracelular aproximadamente 7 vezes maior que as células ATP- submetidas à mesma condição, fatos que são sugestivos da utilização de bombas de efluxo ATP dependentes para remoção de íons H⁺ do interior da célula.

Embora o regulon *sigB* de *L. monocytogenes* ainda não seja completamente determinado, comparando-se a expressão diferencial de um mutante $\Delta sigB$ com o WT, BEGLEY et al. (2006), identificaram 55 genes positivamente regulados por *sigB*, dentre os quais, aqueles com contribuição direta para a tolerância a agentes antimicrobianos (bacteriocinas e antibióticos) foram agrupados em 3 categorias distintas na Tabela 7. Percebe-se, que a expressão de *sigB* implica não somente na reparação da parede celular, como também na realização de diversas alterações sobre a mesma, inclusive através do operon *dlt* já estudado no regulon *virR*. Além disso, nota-se a expressão de bombas de efluxo ATP dependentes utilizadas para a expulsão de prótons para fora da célula e por fim, a síntese de proteínas gerais de defesa ao estresse.

De fato, uma vez que os íons H⁺ possuem caráter catiônico, com a D-alanilação dos ácidos teicóicos (TAs) e lipoteicóicos (LTAs) da parede celular, decorrente da expressão do operon *dlt*, os prótons tendem a sofrer algum nível de repulsão eletrostática, contribuindo assim para o aumento da resistência bacteriana ao meio ácido. Evidentemente tal alteração também produzirá aumento da resistência à nisina e demais CAMPs. Porém, importante ressaltar que podem haver outros mecanismos ainda não identificados responsáveis pelo aumento da resistência cruzada às bacteriocinas a partir de *sigB*, além da superexpressão do operon *dlt*. Assim, configura sugestão para futuras pesquisas comparar a viabilidade entre as cepas WT, $\Delta sigB\Delta virR$ e $\Delta dltA\Delta virR$, submetidas à ATR e cultivadas em meio com nisina.

Tabela 7 – Genes integrantes do regulon *sigB*, com possível contribuição à tolerância a agentes antimicrobianos. Fonte: BEGLEY et al. (2006)

Gene	Função
Relacionados à parede celular	
<i>Imo2591</i>	N-acetilmuramidase
<i>Imo2691</i>	Autolisina
<i>Imo2558</i>	Autolisina (ami)
<i>Imo1076</i>	Autolisina
<i>Imo0971-Imo0974 (operon dlt)</i>	Transfere D-alanina para ácidos lipoteicóicos
<i>Imo2229</i>	Proteína que se liga à penicilina
<i>Imo2754</i>	Proteína que se liga à penicilina
<i>Imo0129</i>	Autolisina
<i>murD</i>	UDP-N- acetilmuramoilalanina D-glutamato ligase
<i>Imo2358</i>	N-acetilglicosamina-6-fosfato isomerase
<i>Imo2427</i>	Proteína de divisão celular
<i>Imo2504</i>	Proteína ligada à parede celular
<i>eutC</i>	Etanolamina amonia liase
<i>Imo0781</i>	Componente do sistema manose-específico PTS
<i>mecA (Imo2190)</i>	Regulador competência negativa
<i>sepA</i>	Proteína da superfamília metalo-beta-lactamase
<i>Imo0956</i>	N-acetilglicosamina-6-fosfato deacetilase
Bombas de Efluxo	
<i>Imo1300</i>	Bomba de efluxo
<i>Imo1409</i>	Bomba de efluxo (MdrL)
<i>Imo2463</i>	Bomba de efluxo
<i>Imo0605</i>	Bomba de efluxo
<i>Imo1226</i>	Bomba de efluxo
Estresse	
<i>Imo0222</i>	Chaperona molecular (HtrO)
<i>Imo0292</i>	Chaperona molecular (HtrA)
<i>Imo1860</i>	Sulfóxido de metionina peptidil redutase

Posteriormente SMITH et al. (2013), complementaram que a superação das condições ácidas por *L. monocytogenes* envolve uma variedade de respostas regulatórias, abrangendo não somente as alterações na fluidez da membrana celular, na composição da parede celular, a bomba de prótons F0F1-ATPase e componentes do regulon *sigB*, como também o sistema regulador LisRK de 2 componentes, a resposta SOS, e pelo menos 2 sistemas enzimáticos que regulam a concentração interna do íon hidrogênio (glutamato descarboxilase e arginina desaminase). Estudos utilizando mutantes demonstram que o sistema glutamato descarboxilase é responsável por proteger *L. monocytogenes* da acidez do estômago.

Por fim, CAMEJO et al. (2009), identificaram através de análise transcriptômica, diversos genes co-regulados por *sigB* e *prfA* em *L. monocytogenes*, os quais constam da Tabela 8, dentre os quais encontramos os genes relacionados à síntese do sistema de manose-fosfotransferase (Man-PTS).

Tabela 8 – Genes integrantes do regulon *sigB*, corregulados por *prfA*. Fonte: Adaptado de CAMEJO et al. (2009)

Gene	Função
Proteínas co-reguladas por SigB e PrfA	
<i>Imo0169</i>	Similar à uma proteína de absorção de glicose
<i>inlH</i>	Internalina H
<i>Imo0439</i>	Fracamente similar à peptídeo sintetase
<i>Imo0539</i>	Similar à tagatose-1,6-difosfato aldolase
<i>Imo0596</i>	Proteína desconhecida
<i>Imo0781</i>	Similar à manose específica do sistema fosfotransferase (PTS) componente IID
<i>Imo0782</i>	Similar à manose específica do sistema fosfotransferase (PTS) componente IIC
<i>Imo0783</i>	Similar à manose específica do sistema fosfotransferase (PTS) componente IIB
<i>Imo0784</i>	Similar à manose específica do sistema fosfotransferase (PTS) componente IIA
<i>Imo0794</i>	Similar à YwnB do <i>Bacillus subtilis</i>
<i>Imo0796</i>	Proteína desconhecida
<i>Imo0994</i>	Proteína desconhecida
<i>opuCD</i>	Proteína osmoprotetora do sistema de transporte permease
<i>Imo1601</i>	Similar à proteína de estresse geral
<i>Imo1602</i>	Proteína desconhecida
<i>Imo2157</i>	Proteína desconhecida
<i>Imo2391</i>	Proteína hipotética similar à YhfK do <i>Bacillus subtilis</i>
<i>Imo2696</i>	Proteína hipotética similar a uma dihidroxiacetona quinase
<i>Imo2697</i>	Proteína desconhecida

Segundo KJOS et al. (2011), o sistema de manose-fosfotransferase (Man-PTS), é um dos principais sistemas de absorção de açúcar em firmicutes e consiste de quatro domínios. IIA e IIB são domínios citosólicos, enquanto IIC e IID formam um complexo localizado na membrana celular, os quais fazem contato com os domínios citosólicos e funcionam como receptor para diversas bacteriocinas, em particular as de classe IIa e IIc. Bacteriocinas da classe IIa (pediocinas-like), possuem ação antilisterial. Frequentemente a exposição de *L. monocytogenes* às pediocinas-like resultam em cepas resistentes, em

decorrência da inibição da expressão dos genes Man-PTS, diminuindo a quantidade de receptores para as bacteriocinas. Tendo em vista, que *sigB* exerce regulação positiva sobre o operon *dlt*, aumentando a resistência à nisina, mas simultaneamente exerce regulação positiva sobre *Imo0781-84*, reduzindo a resistência às pediocinas-like, configura sugestão para futuras pesquisas verificar se a combinação de ambas as substâncias na formulação de um único conservante alimentar apresentaria algum benefício à redução da resistência de *L. monocytogenes* aos peptídeos antimicrobianos.

Por todo exposto, *sigB* terá sua expressão diferencial monitorada no presente trabalho com objetivo de verificar se o uso de nisina na forma nanoencapsulada apresenta algum benefício ou desvantagem à redução da resistência de *L. monocytogenes* a este CAMP. Como um objetivo secundário, também será verificado se há variação na expressão de *sigB* ao empregarmos diferentes concentrações de nisina livre.

1.4.4 *ctsR*

Conforme NAIR et al. (2000), a proteína CtsR, codificada pelo gene *orf1* de *L. monocytogenes*, consiste num regulador negativo (repressor) dos genes de resposta ao estresse classe III – choque térmico. DERRÉ et al. (1999), ressaltam que foram identificados genes homólogos a *ctsR* em diversas outras bactérias gram-positivas, sugerindo que a regulação da resposta ao choque térmico por CtsR seja altamente conservada dentre estes microrganismos.

Embora o regulon *ctsR* ainda não seja totalmente determinado, além de *orf1*, NAIR et al. (2000), descrevem como sendo integrantes do regulon os genes *orf2*, *orf3* e *clpC*, organizados de forma contígua no genoma, porém, não configurando um operon, uma vez que possuem regiões promotoras e operadoras individuais, não havendo a transcrição de um único mRNA portanto.

Ainda segundo NAIR et al. (2000), os genes *orf2*, *orf3* e *clpC*, codificam a síntese de duas proteases (ClpE e CLpP) e uma chaperona (ClpC), todas dependentes de ATP. CHATTERJEE et al. (2006), ainda mencionam uma segunda chaperona dependente de ATP (ClpB), integrante do regulon *ctsR*.

Conforme DERRÉ et al. (1999), as proteases e chaperonas dependentes de ATP desempenham um papel importante na reciclagem de proteínas anormais, assim como proteínas normais de curta duração, como as proteínas regulatórias, conferindo assim uma vantagem adaptativa em situações de estresse. De fato, NAIR et al. (2000), ressaltam que a expressão destas proteínas é induzida com o aumento da temperatura, dentre outras condições, configurando assim a resposta ao choque térmico.

Conforme NAIR et al. (2000), a partir da análise das sequências de nucleotídeos, foram identificados um sítio de ligação para a proteína CtsR na região promotora de *clpP* e dois sítios na região promotora de *clpC* e de *clpE*, evidenciando assim a regulação de CtsR sobre a expressão destes genes. Analisando estes e outros genes integrantes do regulon, DERRÉ et al. (1999), identificaram a sequência concenssual 5'-A/GGTCAAANANA/GGTCAA-3'.

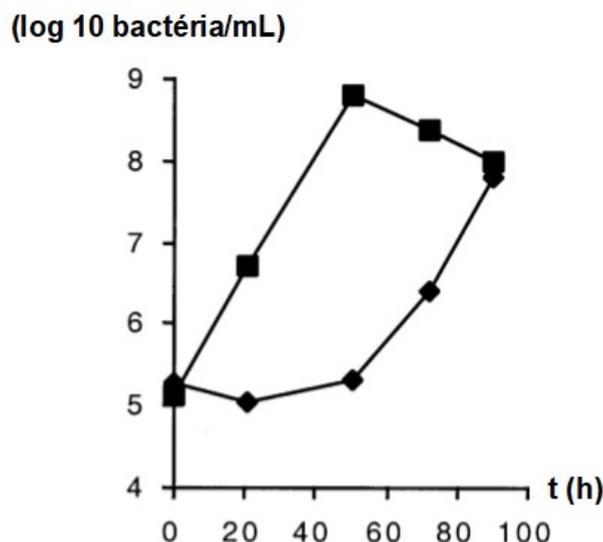


Figura 27 – Curvas de crescimento das cepas WT (losangos) e Δ ctsR (quadrados) de *Listeria monocytogenes* em meio sintético F70, com 2% NaCl a 37 °C. Fonte: NAIR et al. (2000)

NAIR et al. (2000), compararam as curvas de crescimento das cepas WT e Δ ctsR de *L. monocytogenes*, em meio líquido sintético F70, suplementado com 2% de NaCl a 37 °C. Conforme pode ser observado na Figura 27, a cepa WT apresentou uma fase lag característica de 24 h, enquanto o mutante Δ ctsR

notadamente não apresentou fase lag alguma, assim como cresceu com sua taxa máxima durante toda a fase log. Resultados semelhantes foram obtidos repetindo o experimento a 42 °C. Estes resultados estão coerentes com o fato de CtsR atuar como regulador negativo dos genes de resposta ao choque térmico, reduzindo portanto, a expressão de *clpC*, *clpE* e *clpP* comparativamente à expressão da cepa Δ *ctsR*, impactando por consequência a tolerância ao estresse.

Além disso, NAIR et al. (2000), inocularam ambas as cepas de *L. monocytogenes* em camundongos, por via intragástrica, tendo obtido uma DL₅₀ média de 10^{6,6} bactérias/animal para a cepa WT e 10^{4,7} bactérias/animal para o mutante Δ *ctsR*. Estes dados demonstram menor virulência da cepa WT, sugerindo que CtsR também atua reduzindo a virulência. Porém, NAIR et al. (2000), não possuíam subsídios para afirmar se esta redução seria decorrente da própria repressão da resposta ao estresse ou seria decorrente da redução na expressão de *prfA*.

LIU et al. (2013), identificaram a ocorrência natural de um mutante Δ *ctsR* em uma cepa de *L. monocytogenes* Scott A, caracterizada por uma deleção no gene *ctsR*, resultando na produção de uma proteína CtsR truncada composta por apenas 20 aminoácidos, contra 152 aminoácidos na cepa WT. Verificou-se que este mutante não possuía motilidade, era resistente ao pH ácido, calor e pressão, exibindo inclusive níveis de viabilidade 100 vezes maiores que a cepa WT, quando submetida a pressões de 450 MPa. Também foi identificado menor nível de virulência, em consonância com o observado por NAIR et al. (2000).

LIU et al. (2013), também compararam os perfis de expressão gênica de Δ *ctsR* e WT, sob tratamento com 20 µg/mL de nisina, utilizando a tecnologia de microarray. As alterações de expressão identificadas foram confirmadas através de PCR em tempo real e foi utilizado como ponto de corte uma alteração mínima de 2 vezes (para mais ou para menos), com nível de significância de 0,01. Tal procedimento resultou na identificação de 113 genes com superexpressão no mutante Δ *ctsR*, em consonância com o fato de *ctsR* ser um regulador negativo, além de outros 4 genes que foram subexpressos.

Nas Tabelas 9 e 10 são apresentados alguns dos genes com super/subexpressão identificada no trabalho de LIU et al. (2013), e que possam

estar relacionados à alteração da resistência ou virulência de *L. monocytogenes* sob tratamento com nisina.

Tabela 9 – Exemplos de genes que foram superexpressos no experimento. Fonte: LIU et al. (2013)

Categoria / gene	Função	Micro array	qPCR
Biossíntese de ácidos graxos e fosfolipídios			
<i>Imo1834</i>	proteína carreadora de acil	2,3	5,9
Produção e resistência à toxina			
<i>Imo1997</i>	proteína putativa de resistência ao telurito	2,1	2,7
Replicação, recombinação e reparo de DNA			
<i>Imo0054</i>	proteína de ligação à fita simples	2,1	2,5
Proteínas de transporte e ligação: cátions e compostos carregadores de ferro			
<i>Imo1877</i>	transportador ABC manganês, proteína ligada ao ATP	2,1	24,3
Proteínas de transporte, ligação e transdução de sinal			
<i>Imo0030</i>	sistema fosfotransferase, beta-glicosídeo-específico, componente IIABC	4,6	24,3
<i>Imo1175</i>	proteína facilitadora para captação de glicerol	2,0	17,8
<i>Imo1659</i>	transportador ABC putativo, proteína permease	2,2	1,6
<i>Imo2147</i>	transportador ABC, proteína ligada ao ATP	2,6	5,7
Envelope celular			
<i>Imo0056</i>	lipoproteína putativa	3,1	4,4
<i>Imo2240</i>	proteína de membrana putativa	2,7	4,8
<i>Imo2457</i>	proteína de membrana putativa	5,1	3,9
<i>Imo2610</i>	lipoproteína putativa	2,4	1,7

Conforme já descrito no presente trabalho, sabe-se que o operon *dlt*, integrante do regulon *virR*, constituído por proteínas transportadoras citoplasmáticas e proteínas de membrana, é responsável por catalisar a D-alanilação dos ácidos teicóicos (TAs) e lipoteicóicos (LTAs) da parede celular (DEBABOV et al., 2000 e MANDIN et al., 2005). Desta maneira, o aumento da expressão de genes que também codifiquem lipoproteínas e proteínas de membrana, pode potencialmente contribuir para o aumento da resistência de *L. monocytogenes* à nisina.

De maneira análoga, o operon *anr*, também integrante do regulon *virR*, constituído por transportadores ABC, apresenta função de bomba de efluxo, alterando portanto, a carga total do envelope celular (MANDIN et al., 2005 e BONNET et al., 2006). Assim, o aumento da expressão de genes que codificam os mesmos tipos de transportadores, pode potencialmente ter igual contribuição para o aumento da resistência de *L. monocytogenes* à nisina.

Além disso, tendo em vista que o mecanismo de ação da nisina consiste essencialmente na indução da formação de poros na membrana celular bacteriana (WIEDEMANN et al., 2001 e COTTER et al., 2005), o aumento da expressão de um gene relacionado à biossíntese de fosfolipídios, pode potencialmente contribuir para o aumento da resistência de *L. monocytogenes* à nisina.

Outro achado que merece destaque é o aumento da expressão de uma proteína relacionada ao reparo de DNA, cuja contribuição para o aumento da resistência de *L. monocytogenes* à nisina ainda será abordada com maiores detalhes no presente trabalho.

Por fim, de maneira não previsível, LIU et al. (2013), destacam dentre os genes que tiveram expressão aumentada, o gene *telA* (*Imo1997*), responsável por codificar uma proteína putativa de resistência ao telurito, função ainda não compreendida, uma vez que telurito é uma substância bastante rara no meio ambiente

Tabela 10 – Exemplo de gene que foi subexpresso no experimento. Fonte: LIU et al. (2013)

Categoria / gene		Função	Micro array	qPCR
Patogênese				
<i>Imo0213</i>	listeriolisina O		-3,3	-10,0

Dentre os genes subexpressos, destaca-se o gene que codifica a listeriolisina O (LLO). Como já salientado no presente trabalho, LLO é um dos principais fatores de virulência de *L. monocytogenes* e a redução da síntese da mesma está diretamente associada à redução da virulência, uma vez que o microrganismo não somente perde capacidade de invasão dos enterócitos, mas principalmente capacidade de escapar da digestão lisossomal. Este resultado está coerente com a redução de virulência da cepa Δ *ctsR* observadas no trabalho de NAIR et al. (2000) e no próprio trabalho de LIU et al. (2013), sugerindo que esta regulação ocorra diretamente sobre um gene específico e não através de *prfA*.

De forma complementar à investigação realizada por LIU et al. (2013), COLLINS et al. (2010), avaliaram a suscetibilidade de um mutante Δ *telA* à nisina,

comparativamente à cepa WT, em meio líquido contendo 100 a 500 µg/ml de Nisaplin (2,5% de nisina), conforme demonstrado na Figura 28. Como se observa, a cepa $\Delta te/A$ apresentou susceptibilidade progressivamente maior que da cepa WT, conforme o aumento da concentração de nisina no meio.

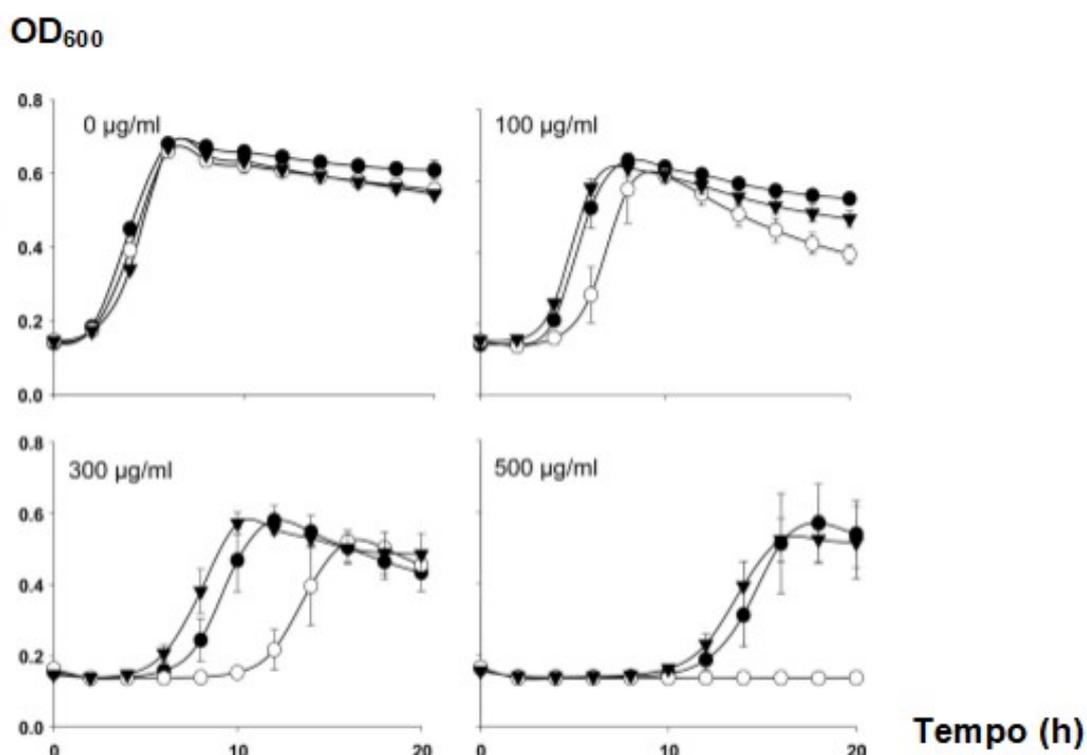


Figura 28 – Curvas de crescimento das cepas WT (círculos cheios), $\Delta te/A$ (círculos vazios) e $\Delta te/A::te/A$ (triângulos cheios) de *Listeria monocytogenes* em meio TSB-YE com 100 a 500 µg/ml de Nisaplin (2,5% de nisina). Fonte: COLLINS et al. (2010)

COLLINS et al. (2010), também realizaram teste de susceptibilidade aos antimicrobianos (TSA) para ambas as cepas, utilizando discos de cefuroxima, cefotaxima, rifampicina, vancomicina, gentamicina, novobiocina e tetraciclina (30 µg cada), sulfometoxazol e trimetoprim (25 µg cada), bacitracina, eritromicina e ampicilina (10 µg cada), meticilina e penicilina G (5 µg cada) e oxacilina (1 µg). Os ensaios revelaram maior susceptibilidade da cepa mutante $\Delta te/A$, comparativamente à cepa WT, apenas para bacitracina, cefotaxima, cefuroxima, meticilina e oxacilina, conforme dados apresentados na Tabela 11

Tabela 11 – Resultados dos TSAs que revelaram maior susceptibilidade da cepa $\Delta te/A$, comparativamente à cepa WT. Fonte: COLLINS et al. (2010)

Antimicrobianos	Tamanho médio da zona de inibição \pm DP (mm)	
	WT	$\Delta te/A$
Bacitracina	12,5 \pm 0,3	15,1 \pm 0,4
Cefotaxima	21,3 \pm 0,3	23,7 \pm 0,3
Cefuroxima	21,1 \pm 0,2	24,4 \pm 0,3
Meticilina	25,6 \pm 0,2	26,7 \pm 0,4
Oxacilina	10,7 \pm 0,3	12,3 \pm 0,2

Para telurito, nisina e alguns antimicrobianos que demonstraram maior susceptibilidade diferencial para a cepa mutante $\Delta te/A$, COLLINS et al. (2010), realizaram estudos subsequentes de determinação da MIC, os quais são apresentados na Tabela 12, onde observa-se uma susceptibilidade duas vezes maior ao antimicrobiano não beta-lactâmico bacitracina e aos antimicrobianos beta-lactâmicos cefotaxima e cefuroxima, uma susceptibilidade quatro vezes maior ao lantibiótico nisina e uma susceptibilidade oito vezes maior ao lantibiótico galidermina. Não houveram diferenças entre as MICs obtidas com $\Delta te/A$ e WT, tanto para oxacilina, como para a metilina.

Tabela 12 – Concentrações inibitórias mínimas que revelaram maior susceptibilidade da cepa $\Delta te/A$, comparativamente à cepa WT. Fonte: COLLINS et al. (2010)

Antimicrobianos	MICs ($\mu\text{g/mL}$)	
	WT	$\Delta te/A$
Bacitracina	256	128
Cefotaxima	2	1
Cefuroxima	2,87	1,44
Galidermina	1,97	0,246
Nisina	25,14	6,29
Telurito	38	19

Conforme COLLINS et al. (2010), ambos os lantibióticos são inibidores da síntese de peptidoglicanos como consequência da ligação ao lipídio II. Além disso, a nisina e ocasionalmente a galidermina, também formam poros na membrana celular dos microrganismos alvo. Já a cefotaxima e cefuroxima inibem a ligação cruzada das cadeias peptidoglicanas, enquanto a bacitracina afeta a desfosforilação do bactofenol durante a síntese do peptidoglicano. Observa-se

portanto, que embora por mecanismos diferentes, todos os agentes em questão atuam sobre a parede celular do microrganismo.

Assim, o trabalho de COLLINS et al. (2010), representa o primeiro relato científico de uma nova via de resistência de *L. monocytogenes* a diversos antimicrobianos que atuam sobre a parede celular, incluindo nisina, mediada pela expressão do gene *te/A*.

Percebe-se por todo acima exposto, constituir fato suficientemente demonstrado pela literatura científica, a modulação da resistência de *L. monocytogenes* aos CAMPs, através do nível de expressão de *ctsR*. Com isso, o último aspecto pendente de comprovação experimental seria se o aumento da concentração do peptídeo no meio, é capaz de alterar o nível de expressão de *ctsR*. A síntese deste raciocínio pode ser visualizada facilmente no fluxograma da Figura 29.

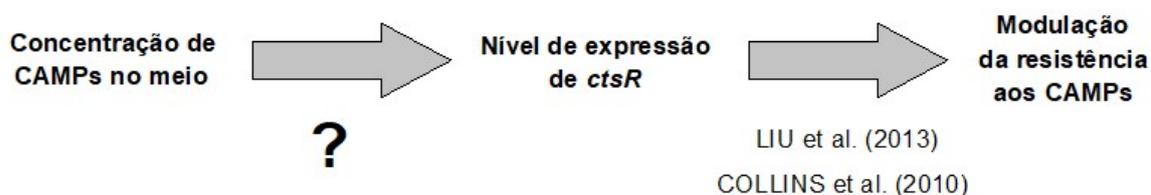


Figura 29 – Síntese do raciocínio construído. Fonte: O autor

1.4.5 *sod*, *kat* e *Imo1433*

Convém ressaltar inicialmente que até o item anterior, foram apresentados genes reguladores de *L. monocytogenes*, associados diretamente à resistência e/ou virulência do microrganismo. No presente item, serão apresentados genes com funções específicas (não-reguladores), os quais não estão diretamente relacionados aos mecanismos de resistência aos CAMPS, mas à resposta fisiológica do microrganismo em situação de estresse oxidativo, decorrente do emprego da nisina.

Conforme BERRA et al. (2006), espécies reativas de oxigênio (EROs ou ROS em inglês) é uma denominação que abrange os radicais livres de oxigênio

como o radical superóxido (O_2^-), hidroxila (OH^-), óxido nítrico (NO^-), peroxinitrito ($OONO^-$), alcóxila (RO^-) e peróxila (RO_2^-), dentre outros, mas também derivados do oxigênio que não constituem radicais, como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ácido hipocloroso ($HOCl$), ozônio (O_3) e oxigênio singlete (O_2)₂, dentre outros.

Segundo BARBOSA et al. (2010), a produção contínua das EROs durante os processos metabólicos normais das células, resultou no desenvolvimento dos chamados mecanismos de defesa antioxidante com o objetivo de limitar os níveis intracelulares destas substâncias.

Porém, BERRA et al. (2006), ressaltam que quando a formação das EROs excede a capacidade antioxidante celular, resultará a ocorrência de lesão às macromoléculas tais como lipídios, proteínas e DNA, caracterizando o que se denomina estresse oxidativo, podendo resultar inclusive na morte celular ou na ocorrência de mutações.

Conforme BARBOSA et al. (2010), as defesas antioxidantes podem ser classificadas em:

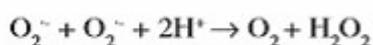
A) Não-enzimáticas

Compreende quaisquer substâncias que presentes em menores concentrações que a do substrato oxidável, sejam capazes de atrasar ou inibir a oxidação deste de maneira eficaz. Ex: β -caroteno (vit. A), ácido ascórbico (vit. C), α -tocoferol (vit. E), licopeno, resveratrol, polifenóis, metais como Cu, Zn, Mn, e Se, dentre outras substâncias.

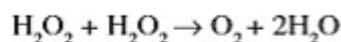
B) Enzimáticas

Compreendem as enzimas responsáveis pela remoção catalítica das EROs. Ex: Superóxido dismutase, catalase, glutathione peroxidase e glutathione reductase.

- Superóxido dismutase (SOD): Catalisa a conversão do radical livre superóxido em peróxido de hidrogênio;



- Catalase (CAT): Catalisa a conversão do peróxido de hidrogênio em oxigênio e água;



- Glutathione peroxidase (GPx): Catalisa a conversão do peróxido de hidrogênio em duas moléculas de água, a partir da oxidação de duas moléculas de glutathione reduzida. Trabalha em conjunto com a enzima glutathione redutase (GRd), a qual é responsável por catalisar a regeneração da molécula de glutathione reduzida, a partir de um NADPH e um H^+ . Para melhor compreensão as reações podem ser visualizadas na Figura 30.

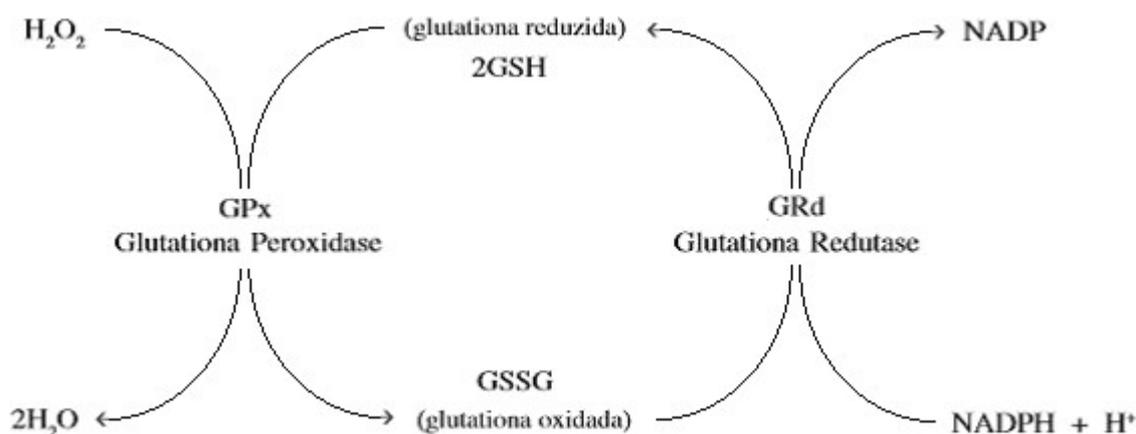


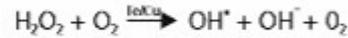
Figura 30 – Reações associadas ao sistema GPx/GRd. Fonte: Adaptado de BARBOSA et al. (2010)

Conforme destaca BARBOSA et al. (2010), as enzimas CAT e GPx têm como objetivo comum impedir o acúmulo de peróxido de hidrogênio na célula, fato de fundamental importância, uma vez que essa espécie reativa, mediante a presença de metais como ferro e cobre, através das reações de Fenton e Haber-Weiss, resultam na formação do radical hidroxila, contra o qual não há nenhum sistema enzimático de defesa. Por este motivo, o radical hidroxila vem sendo indicado como o radical livre mais danoso à integridade das macromoléculas.

- Reação de Fenton:



- Reação de Haber-Weiss:



A síntese completa de todas reações apresentadas pode ser visualizada na Figura 31.

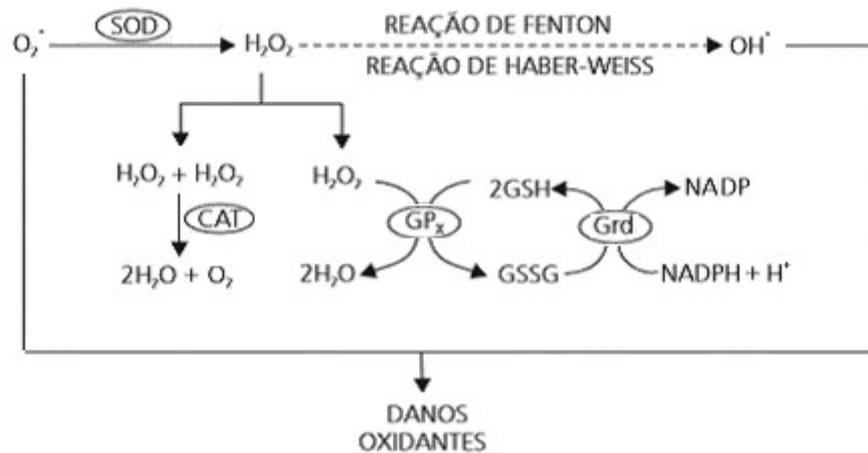


Figura 31 – Síntese das reações apresentadas. Fonte: Adaptado de BARBOSA et al. (2010)

Particularmente o dano às macromoléculas decorre de um balanço entre a quantidade de EROs e a quantidade de agentes antioxidantes presentes na célula. Assim, mesmo que haja uma produção elevada de EROs, levanta-se a hipótese que caso a célula seja igualmente competente em prover agentes antioxidantes, resultará pouco ou nenhum dano às macromoléculas, podendo desta forma configurar um mecanismo de resistência aos CAMPs. Por esta razão, torna-se mais interessante monitorar o nível de EROs do que propriamente a quantidade de danos às macromoléculas.

Por sua vez, uma alternativa ao monitoramento direto do nível de EROs consiste em monitorar o nível de agentes antioxidantes na célula. Agentes antioxidantes não enzimáticos têm em sua grande maioria origem exógena, não refletindo portanto uma resposta do microrganismo ao nível de estresse oxidativo. Já os mecanismos enzimáticos, decorrem da expressão gênica da célula, regulada em função da concentração de EROs na mesma. Assim, constituem um

excelente biomarcador para avaliação do nível de EROs a que a célula foi submetida.

Adicionalmente, é possível aproveitar a técnica de RT-qPCR já empregada no presente trabalho, para o monitoramento da síntese de agentes antioxidantes enzimáticos pelas células bacterianas, não demandando assim a utilização de nenhuma outra técnica adicional.

Por todo exposto, *sod* (codifica a síntese de superóxido dismutase), *kat* (codifica a síntese de catalase) e *Imo1433* (codifica a síntese de glutathione redutase), terão sua expressão diferencial monitorada no presente trabalho, como critério de segunda ordem, com objetivo de verificar se o uso de nisina na forma nanoencapsulada apresenta algum benefício ou desvantagem em relação ao nível de estresse oxidativo induzido em *L. monocytogenes*, comparativamente ao emprego de nisina livre.

1.4.6 *recA*, *lexA* e *dnaA*

Mesmo que as células bacterianas estejam providas de mecanismos de resistência aos CAMPS, sendo capazes de evitar a morte celular em decorrência direta dos danos causados sobre a membrana plasmática, a expressão destes genes e adaptações necessárias do metabolismo celular em tal condição, por períodos de tempo prolongados, podem acabar resultando na formação de EROs em concentrações superiores à capacidade antioxidante celular, resultando na ocorrência de estresse oxidativo, com conseqüente dano às macromoléculas de forma geral, incluindo dentre estas o DNA cromossomal. Dependendo do tipo, extensão e localização, as lesões sobre o DNA podem resultar igualmente na morte celular. Assim, a indução de danos sobre o DNA em decorrência do estresse oxidativo constitui outro possível mecanismo de ação dos CAMPs sobre *L. monocytogenes*. Porém, as células bacterianas possuem mecanismos de reparo para as lesões no DNA, em relação aos quais levanta-se a hipótese que conforme sua eficiência também possam vir a configurar mecanismos de resistência aos CAMPs.

Conforme ZAHA et al. (2012), os principais mecanismos de reparo do DNA lesionado em procariotos são o reparo de malpareamento (MMR), a fotorreativação, os reparos por excisão de base (BER), e por excisão de nucleotídeo (NER), os reparos de quebra de fita dupla (DSB) por recombinação homóloga e junção de extremidades não-homólogas (NHEJ), além da síntese de DNA translesão.

O sistema de reparação de malpareamentos (MMR) dos procariotos, conforme descrevem ZAHA et al. (2012), é mais voltado para a correção do erro de inserção de nucleotídeos pela DNA-polimerase ocorrido durante a replicação, o qual se não corrigido antes do próximo ciclo de replicação, poderá tornar-se uma mutação permanente.

Já o mecanismo de fotorreativação, realizado em duas etapas, também segundo descrito por ZAHA et al. (2012), é mais voltado para a correção da ligação covalente estabelecida entre duas pirimidinas adjacentes, em decorrência da exposição do DNA à radiação ultravioleta.

COX et al. (2012), salientam que nas demais situações de DNA danificado, o modo de reparação mais empregado pelas células é o reparo por excisão, podendo ser de dois tipos. O reparo por excisão de base (BER), conforme descrito por ZAHA et al. (2012), corrige lesões causadas nas bases nitrogenadas, como por exemplo as decorrentes da ação de agentes oxidantes (EROs), através da utilização de enzimas específicas para cada tipo de lesão. Já no reparo por excisão de nucleotídeo (NER), conforme descrevem WATSON et al. (2015), não há necessidade do reconhecimento de um tipo de lesão específico, mas apenas distorções na dupla-hélice, como as distorções causadas pela presença de um aduto volumoso sobre uma base. COX et al. (2012), salientam que por esse motivo, o sistema NER pode remover lesões no DNA de inúmeros tipos, até mesmo aquelas causadas por novas substâncias químicas que sequer existiam no meio ambiente. O sistema SOS controla grande parte dos genes do sistema NER, induzindo uma expressão basal em condições normais e uma elevada expressão quando ocorrem lesões no DNA.

Conforme ZAHA et al. (2012), uma grande variedade de agentes como por exemplo as radiações ionizantes (exógenos) ou as EROs (endógenos), são

capazes de promover quebras de fita dupla (DSBs) no DNA, clivando simultaneamente ambas as fitas. Segundo WATSON et al. (2015), as DSBs são o tipo mais citotóxico de todos os danos no DNA, podendo resultar caso não sejam reparadas, condições extremamente deletérias, como o bloqueio da replicação celular, a transformação genética e a morte celular. Porém, COX et al. (2012), salientam que as DSBs não podem ser reparadas por nenhum dos mecanismos já explicados, em razão da ausência de uma fita molde íntegra no local da quebra. Conforme ZAHA et al. (2012), devido a seu reduzido tempo de geração, as bactérias frequentemente possuem uma cópia extra de seu cromossomo, possibilitando assim a reparação das DSBs através do mecanismo de recombinação homóloga. Conforme ZAHA et al. (2012), a proteína central envolvida na recombinação homóloga é a proteína recombinase A (RecA). Importante ressaltar que nenhuma reação ocorre se a proteína RecA for misturada a uma molécula de DNA intacta. Porém, a ligação de RecA aos fragmentos de DNA fita simples (ssDNA), ativa nesta proteína a atividade de reparação por recombinação. Com isso RecA se torna capaz de parear duas moléculas homólogas de DNA, catalisar as reações de trocas de fitas, levando à formação do heteroduplex de DNA.

Conforme COX et al. (2012), a reparação por recombinação homóloga é uma estratégia efetiva, porque o cromossomo homólogo fornece um molde para o restabelecimento preciso da sequência original ao longo do sítio de quebra. Porém, em algumas situações, a dupla quebra ocorre antes que a replicação do DNA tenha produzido um cromossomo homólogo. Neste caso é utilizado um sistema alternativo de reparo de DSB, denominado junção de extremidades não-homólogas (NHEJ). Como a sequência original no local da dupla quebra não pode ser recuperada, a NHEJ é mutagênica. Porém, é preferível para a célula realizar um reparo com mutação a manter um dupla quebra no DNA.

Ainda conforme COX et al. (2012), por vezes a lesão ocorre em uma forquilha de replicação, após as fitas de DNA terem sido desenoveladas, não sendo possível portanto, a atuação de nenhum dos mecanismos de reparo descritos anteriormente, resultando no travamento sobre a lesão, da DNA polimerase responsável pela replicação. ZAHA et al. (2012), descrevem que

nestes casos a célula utiliza como último recurso, o mecanismo de síntese translesão ou sistema de reparação sujeito a erro, em que qualquer uma das quatro bases é inserida no local lesado, a fim de garantir o prosseguimento do processo de replicação, assegurando a fase correta de leitura do DNA, mesmo que sob o preço de uma mutação. Conforme WATSON et al. (2015), devido ao seu alto nível de mutagênese, as DNA polimerases translesão são fortemente reguladas, sendo ativadas apenas através de uma via conservada denominada “resposta SOS”.

VEEN et al. (2010), determinaram o regulon da resposta SOS em *L. monocytogenes* através da expressão diferencial entre WT e um mutante $\Delta recA$, após exposição à mitomicina C (MMC), sendo constituído por 29 genes, organizados em 16 operons, os quais são relacionados na Tabela 13.

Conforme VEEN et al. (2010), destacam-se dentre os genes integrantes do regulon SOS de *L. monocytogenes*, aqueles responsáveis por codificar os reguladores da resposta SOS RecA e LexA, as polimerases translesão IV e V e as exonucleases UvrA e UvrB do sistema de reparo por excisão de nucleotídeo (NER).

KELLEY (2006), descreve que havendo a presença de DNA fita simples na célula (ssDNA), substrato que é encontrado somente em condições de dano ao DNA ou existência de forquilhas de replicação paralisadas, a proteína recombinase A (RecA) se liga aos ssDNA formando filamentos de nucleoproteínas (ssDNA-RecA), ativando assim a reparação por recombinação homóloga, através do pareamento de duas moléculas homólogas de DNA e através da catálise das reações de troca de fitas, resultando assim na formação do heteroduplex.

Porém, ZAHA et al. (2012), complementam que uma vez ativada, RecA ainda possui uma segunda função chave, caracterizada pela atividade proteolítica dos filamentos de ssDNA-RecA sobre LexA, induzindo assim a expressão dos genes que integram a resposta SOS, os quais se encontravam sob repressão daquela proteína.

Tabela 13 – Nomes e respectivas funções do genes integrantes do regulon da resposta SOS. Fonte: adaptado de VEEN et al. (2010)

Gene	Função
<i>Imo0157</i>	helicase ATP dependente predicta
<i>Imo0158</i>	hidrolase predicta
<i>Imo1302</i> <i>lexA</i>	repressor da resposta SOS
<i>Imo1303</i> <i>yneA</i>	proteína YneA similar ao <i>Bacillus subtilis</i>
<i>Imo1398</i> <i>recA</i>	catalisa o reparo de DSBs por recombinação homóloga, ativador da resposta SOS
<i>Imo1421</i> <i>bilEA</i>	proteína ligada à ATP, sistema de transporte osmoprotetor, resistência à bile
<i>Imo1422</i> <i>bilEB</i>	proteína permease, sistema de transporte osmoprotetor, resistência à bile
<i>Imo1574</i> <i>dnaE</i>	subunidade α da DNA polimerase III
<i>Imo1638</i>	peptidase predicta
<i>Imo1639</i>	DNA-3-metiladenina glicosidase (BER)
<i>Imo1640</i>	proteína hipotética
<i>Imo1758</i> <i>ligA</i>	DNA ligase NAD dependente
<i>Imo1759</i> <i>pcrA</i>	DNA helicase ATP dependente
<i>Imo1975</i> <i>dinB</i>	DNA polimerase IV
<i>Imo2220</i>	exonuclease predicta
<i>Imo2221</i>	proteína hipotética
<i>Imo2222</i>	exonuclease reparadora DNA predicta
<i>Imo2264</i>	proteína hipotética
<i>Imo2265</i>	proteína hipotética
<i>Imo2266</i>	hidrolase predicta
<i>Imo2267</i>	helicase ATP dependente predicta
<i>Imo2268</i> <i>addB</i>	helicase ATP dependente predicta
<i>Imo2271</i>	proteína do bacteriófago A118
<i>Imo2332</i> <i>int</i>	DNA recombinase integrase do bacteriófago A118
<i>Imo2488</i> <i>uvrA</i>	subunidade A da exinuclease ABC
<i>Imo2489</i> <i>uvrB</i>	subunidade B da exinuclease ABC
<i>Imo2675</i> <i>umuD</i>	DNA polimerase V
<i>Imo2676</i> <i>umuC</i>	DNA polimerase V
<i>Imo2828</i>	proteína predicta equivalente à subunidade UmuD da polimerase V de bactérias gram-negativa

A degradação de LexA, inclusive, aumenta em cerca de 50 vezes a expressão do gene *recA*, objetivando assegurar quantidades suficientes da proteína RecA para a realização do reparo, como também para a degradação completa da proteína repressora LexA. Outro gene integrante da resposta SOS com a expressão ativada é o próprio *lexA*, com objetivo de assegurar que imediatamente após a conclusão do reparo por recombinação, cessando a atividade proteolítica sobre LexA portanto, todo o sistema SOS retorne

rapidamente a sua condição inicial de repressão, caracterizando assim uma autorregulação de *lexA*.

VEEN et al. (2010), identificaram ainda a presença da sequência consenso CGAACATATGTTTCG na região promotora de todos os genes do regulon da resposta SOS, constituindo portanto, o sítio no qual a proteína LexA se liga, a fim de reprimir a expressão da resposta SOS.

Uma vez que o sistema SOS promove a ativação do mecanismo de reparo por síntese translesão, o qual é mutagênico, pode-se estabelecer assim uma correlação entre o aumento de DSBs ou forquilhas de replicação paralisadas, com o aumento da expressão de *recA*, a redução da concentração de LexA, a desrepressão do sistema SOS, o aumento da capacidade de reparo do DNA, o aumento da taxa de mutação e por fim, eventual aumento da resistência de *L. monocytogenes* à nisina.

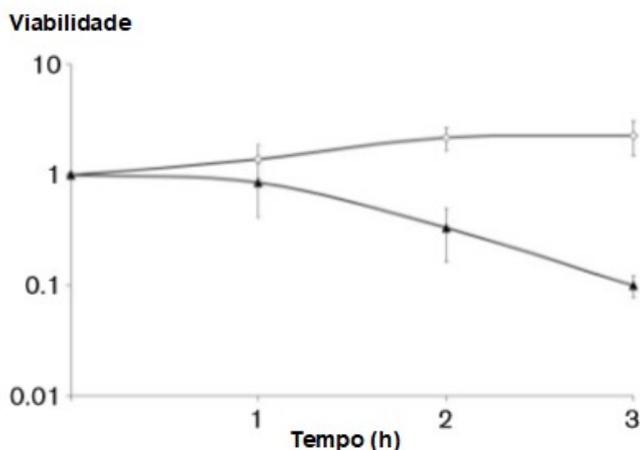


Figura 32 – Viabilidade em meio BHI, contendo 1 mg/L de MMC, para as linhagens WT (branco) e $\Delta recA$ (preto). Fonte: VEEN et al. (2010)

Como comprovação experimental desta tese, VEEN et al. (2010), realizaram o cultivo em meio BHI de 2 linhagens de *L. monocytogenes* (WT e $\Delta recA$), e realizaram a contagem de células viáveis 1 h, 2 h e 3 h após a adição de 1 mg/L de mitomicina C (MMC). Conforme se observa na Figura 32, a linhagem WT apresentou crescimento exponencial da viabilidade, enquanto a

linhagem $\Delta recA$ demonstrou acentuada redução da mesma, resultados condizentes com o esperado, uma vez que na ausência de RecA, não ocorre a clivagem de LexA, resultando em taxas de reparo e mutação menores e portanto, apresentando menos resistência ao agente antimicrobiano.

Para verificar a ativação da resposta SOS, foi realizado um estudo de promotor-reporter para *recA*, evidenciando 1 h após a adição da MMC, a expressão do gene na linhagem WT e ausência de expressão na linhagem $\Delta recA$.

VEEN et al. (2010), repetiram o mesmo experimento, em meio de cultura BHI, porém, adicionando 0,05 $\mu\text{g/mL}$ de rifampicina ou 75 $\mu\text{g/mL}$ de estreptomicina (estas concentrações foram as MICs). Conforme demonstrado na Figura 33, a fração resistente à rifampicina na cultura WT foi de $1,25 \times 10^{-7}$, cerca de 14 vezes mais resistente à fração da cultura $\Delta recA$. De forma análoga, a fração resistente à estreptomicina foi de $1,33 \times 10^{-8}$, enquanto a cultura $\Delta recA$ não demonstrou nenhuma fração resistente à estreptomicina. Estes resultados corroboram mais uma vez que na ausência de RecA, não ocorre a clivagem de LexA, resultando em taxas de reparo e mutação menores e portanto, apresentando menos resistência ao agente antimicrobiano.

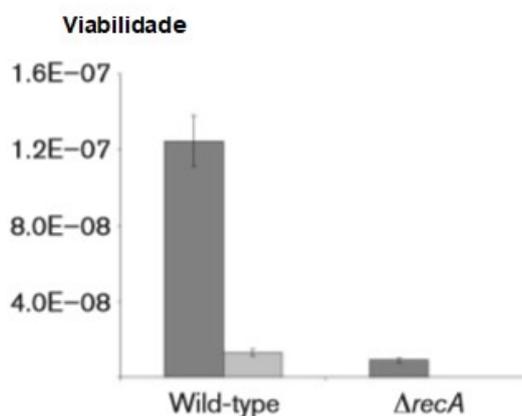


Figura 33 – Viabilidade em meio BHI, das linhagens WT e $\Delta recA$, após exposição à rifampicina (cinza escuro) e estreptomicina (cinza claro). Fonte: VEEN et al. (2010)

Outro aspecto a salientar é que conforme bulário eletrônico da ANVISA, mitomicina C é um agente alquilante, inibidor da síntese de DNA, RNA e proteínas, rifampicina inibe a atividade da RNA polimerase bacteriana, impedindo

a síntese de mRNA e estreptomicina, liga-se à unidade 30S do ribossomo bacteriano, alterando sua conformação e resultando na leitura incorreta do mRNA. Conclui-se portanto, que nenhum dos antimicrobianos em questão, têm como mecanismo principal de ação, o dano direto ao DNA bacteriano. Porém, como demonstram os dados experimentais, a adequação do metabolismo bacteriano à presença dos antimicrobianos, resulta em danos importantes e significativos ao DNA, possivelmente como decorrência do estresse oxidativo. Esses dados vêm corroborar com a hipótese levantada no presente trabalho, que embora o mecanismo principal de ação da nisina consista em danificar a membrana celular alterando sua permeabilidade seletiva, o estresse oxidativo decorrente da adaptação do metabolismo bacteriano à presença do peptídeo antimicrobiano também configure um mecanismo de ação relevante.

VEEN et al. (2010), ainda investigaram a viabilidade de ambas as culturas (WT e $\Delta recA$), ao aquecimento (55 °C), estresse oxidativo (60mM H₂O₂) e meio ácido (pH 3,4). Após 1 h de exposição ao agente estressor, conforme esperado, a linhagem $\Delta recA$ apresentou viabilidade muito inferior a da linhagem WT, para todos agentes estressores, conforme se conclui a partir da observação da Figura 34. Estes resultados igualmente corroboram com a conclusão que na ausência de RecA, não ocorre a clivagem de LexA, resultando em taxas de reparo e mutação menores e portanto, apresentando menos resistência ao agente estressor.

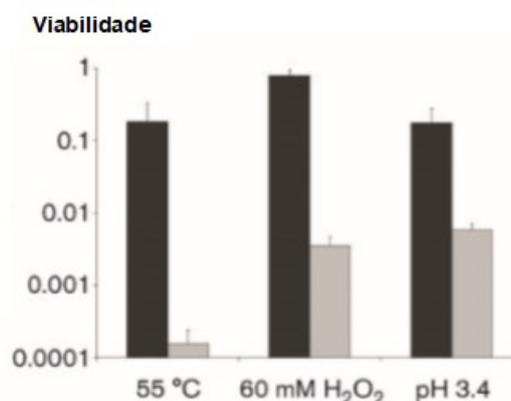
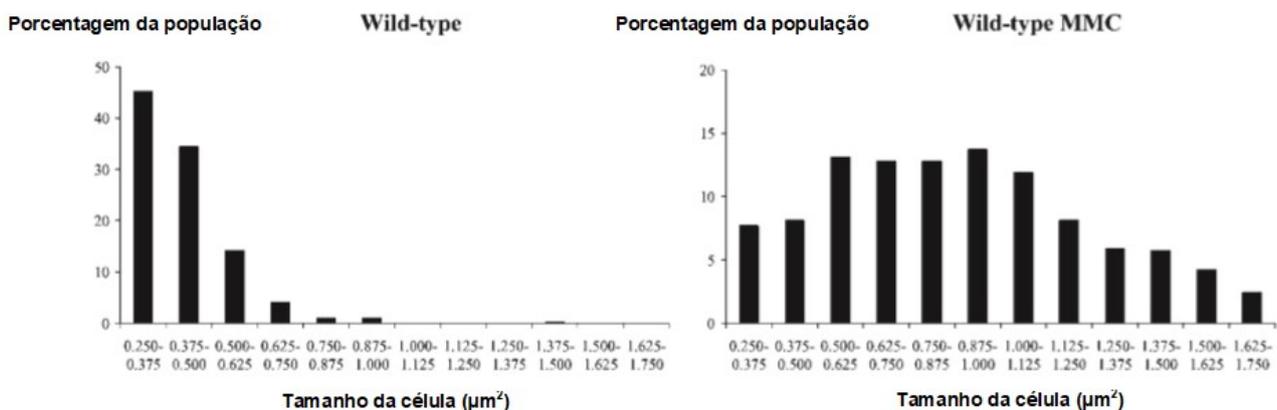


Figura 34 – Viabilidade em meio BHI, sob ação de diferentes agentes estressores, para as linhagens WT (cinza escuro) e $\Delta recA$ (cinza claro). Fonte: VEEN et al. (2010)

Particularmente no caso do estresse oxidativo, o qual integra o segundo mecanismo de ação proposto para a nisina, observamos que a viabilidade na linhagem $\Delta recA$ é de aproximadamente 3 ordens de grandeza menor.

Novamente estudos de promotor-reporter realizados 30 min após a exposição ao agente estressor, evidenciaram a transcrição do gene *recA* em todas as situações para a linhagem WT. Todos resultados apresentados sugerem que a proteína RecA é responsável pela clivagem de LexA, resultando em aumento das taxas de reparo e mutação do DNA, e em última instância no aumento da resistência ao estresse oxidativo promovido pelos CAMPs, conforme se pretendia demonstrar.

Outro aspecto envolvido na ativação da resposta SOS parece ser a inibição da divisão celular. VEEN et al. (2010), realizaram a captura e análise das imagens de microscópio, de cepas tipo selvagem (WT) e $\Delta yneA$, antes e depois da exposição à MMC por 1 h. A distribuição de tamanhos em cada condição experimental, obtida para 3 replicatas com no mínimo 500 células cada, é apresentada na Figura 35. Observa-se que após a exposição à MMC, houve um aumento significativo no tamanho das cepas tipo selvagem (WT), comparativamente ao tamanho das células antes da exposição, enquanto não houve nenhum aumento significativo para as cepas $\Delta yneA$.



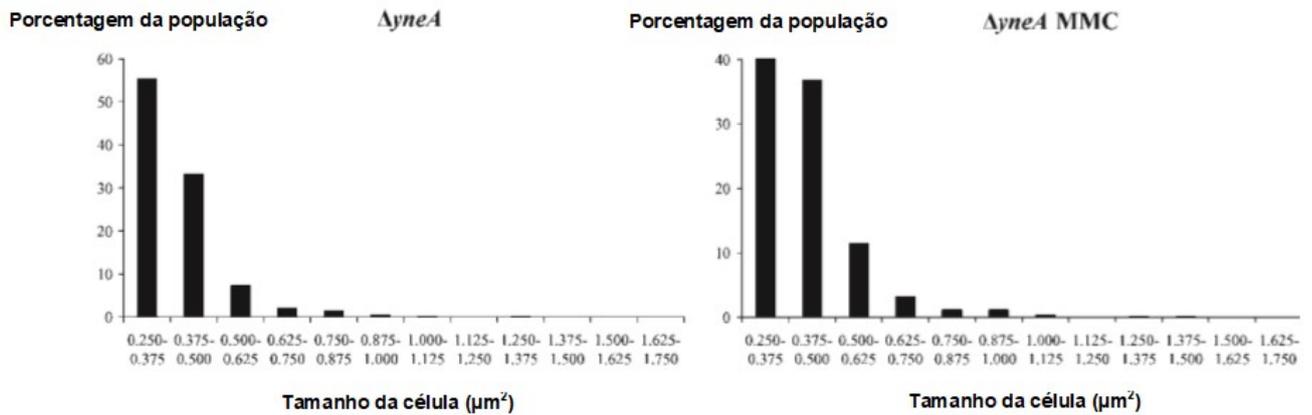


Figura 35 – Distribuição de tamanho das cepas WT e *ΔyneA*, antes e após o tratamento por 1h com MMC. Fonte: VEEN et al. (2010)

Resultado semelhante já havia sido demonstrado por KAWAI et al. (2003), onde o diâmetro médio de células tipo selvagem (círculos), *ΔyneA* (quadrados), *ΔrecA* (triângulos) e *ΔrecAΔyneA* (losangos), antes (figuras vazadas) e depois (figuras cheias) do tratamento com 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de MMC, foram determinados utilizando imagens de fase-contraste capturadas a 30, 60 e 90 min após a adição do fármaco e o diâmetro médio determinado pela leitura de no mínimo 300 células. Os resultados são apresentados na Figura 36.

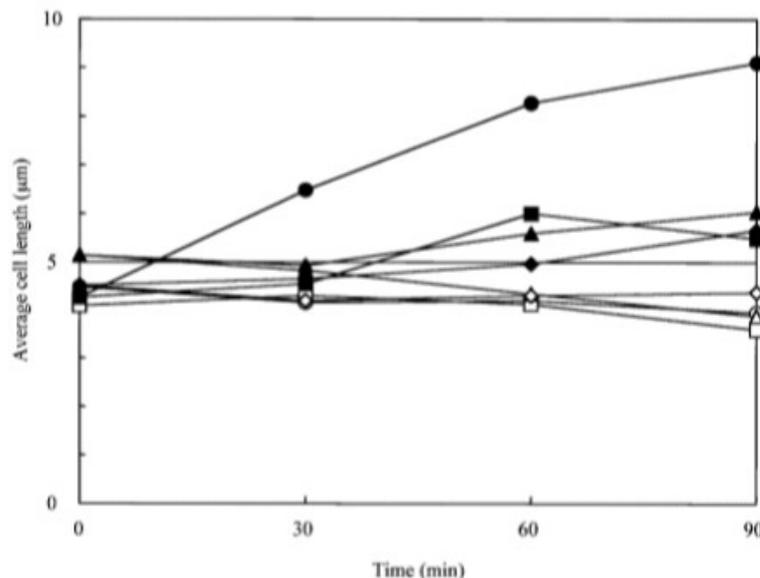


Figura 36 – Diâmetro médio das cepas WT (círculos), *ΔyneA* (quadrados), *ΔrecA* (triângulos) e *ΔrecAΔyneA* (losangos), antes (figuras vazadas) e depois (figuras cheias) do tratamento com MMC. Fonte: KAWAI et al. (2003)

Todos resultados apresentados sugerem que a proteína YneA é responsável pela supressão da divisão celular durante a resposta SOS, promovendo assim por consequência o aumento do tamanho das células.

Por todo exposto, *recA* e *lexA* terão sua expressão diferencial monitorada no presente trabalho com objetivo de verificar se o uso de nisina na forma nanoencapsulada apresenta algum benefício ou desvantagem em relação à redução da resistência de *L. monocytogenes* a este CAMP, comparativamente ao emprego de nisina livre. Como um objetivo secundário, também será verificado se há variação na expressão de *recA* e *lexA* ao empregarmos diferentes concentrações de nisina livre, tendo em vista que não foram encontrados trabalhos nessa linha.

Tendo em vista ainda que a divisão celular configura uma possível resposta fisiológica do microrganismo à injúria e que ao aumento da carga bacteriana pode-se associar infecção de maior gravidade para o hospedeiro, a variação na taxa de divisão celular também será monitorada no presente trabalho, como critério de segunda ordem. Porém, considerando que possam haver outros mecanismos de regulação atuando sobre a divisão celular além da inibição por *yneA*, conforme trabalho de CAMEJO et al. (2009), tal monitoramento será realizado através da expressão diferencial de *dnaA*, o qual é responsável pela iniciação da replicação cromossomal em *L. monocytogenes*.

Embora ainda carente de comprovações experimentais, o raciocínio construído nas últimas duas seções pode ser sintetizado através do fluxograma da Figura 37.

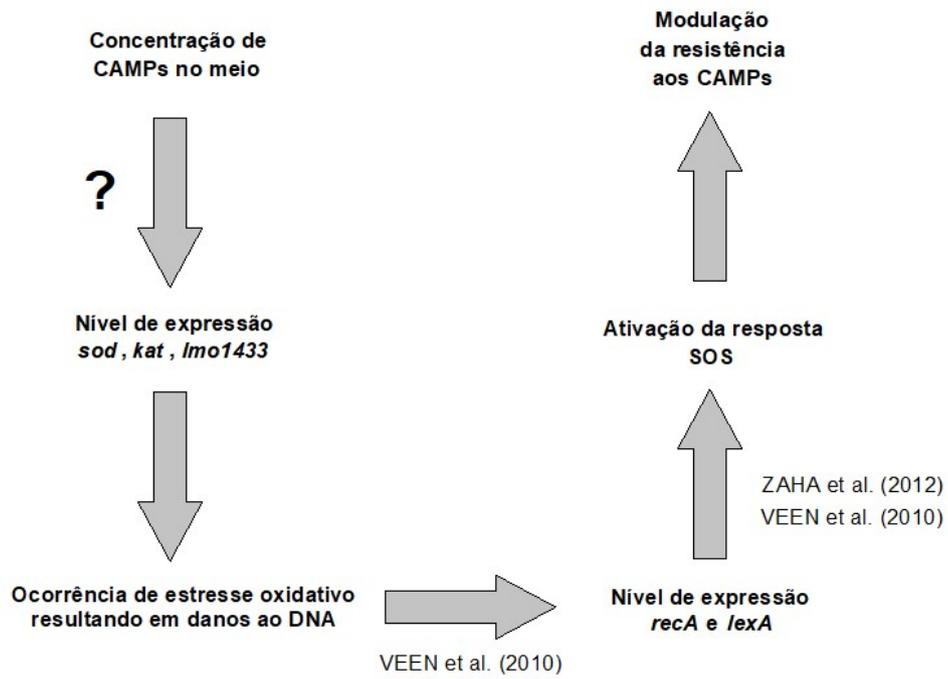


Figura 37 – Síntese do raciocínio construído. Fonte: O autor

2. Objetivos

2.1 Objetivo geral

O presente trabalho tem como objetivo geral avaliar de maneira consistente o efeito inibitório e a expressão de genes associados à resistência de *L. monocytogenes* exposta à nisina A, nas formas livre e nanoencapsulada em lipossomos de fosfatidilcolina do tipo LUV.

2.2 Objetivos específicos

A) Obter as curvas de crescimento de *L. monocytogenes* com adição de nisina livre em diferentes concentrações no meio, a fim de definir a concentração a ser utilizada para encapsulação nos lipossomos, assim como possibilitar a avaliação do efeito inibitório nestas condições experimentais;

B) Produzir e caracterizar lipossomos de fosfatidilcolina controle e com nisina nanoencapsulada;

C) Obter as curvas de crescimento de *L. monocytogenes* com adição dos lipossomos controle e com nisina nanoencapsulada, a fim de possibilitar a avaliação do efeito inibitório nestas condições experimentais;

D) Realizar extração de RNA total das amostras nas diferentes condições de cultivo, a saber, nisina livre, lipossomo branco e lipossomo com nisina nanoencapsulada;

E) Definir critérios e projetar os primers *forward* e *reverse* para os genes selecionados, necessários para a transcrição reversa assim como para a amplificação por PCR em tempo real, tanto pela metodologia convencional (RT-qPCR) quanto pela metodologia DNase Free (DNF-RT-qPCR);

F) Estudar as principais variáveis envolvidas na quantificação relativa da expressão gênica através da metodologia de RT-qPCR, objetivando a obtenção de resultados consistentes;

G) Produzir os cDNAs e realizar o PCR em tempo real pela metodologia DNase Free (DNF-RT-qPCR) de todas as amostras extraídas, a fim de possibilitar a avaliação da expressão dos genes associados à resistência à nisina.

3. Materiais e métodos

3.1 Preparo da formulação de nisina

A nisina foi obtida a partir do produto comercial Nisaplin (Danisco do Brasil Ltda). Segundo o fabricante, a formulação contém essencialmente 2,5% de nisina pura, dispersa em leite em pó. Como já anteriormente descrito, a nisina é praticamente insolúvel em meio neutro ou alcalino. Assim, para sua solubilização foram adicionados num tubo Falcon, 1.000 mg de Nisaplin e 5 mL de HCl 0,1 M. O tubo foi agitado em vortex, na potência máxima, por 10 min e a mistura foi filtrada através de um filtro de seringa de malha 0,2 µm, para esterilização do material.

Outro aspecto a ser ressaltado é que a fosfatidilcolina não permanece estável em meio ácido. Assim, foi necessário o tamponamento da solução de nisina (2X), diluindo-a em igual volume de tampão fosfato 0,01 M; pH 6,4 resultando numa solução de nisina tamponada com 2,5 mg/mL de concentração.

3.2 Preparo dos lipossomos

A encapsulação da nisina em lipossomos de fosfatidilcolina foi realizada pelo método de hidratação de filme fino, seguido do método de redução de tamanho por sonicação, conforme MERTINS et al. (2008) e MALHEIROS et al. (2010b). Para tal, num balão de vidro 250 mL com fundo redondo, foram pesados $76,0 \pm 0,2$ mg de fosfatidilcolina (Phospholipon 90G da Lipoid) e dissolvidos em 10 mL de clorofórmio. O solvente orgânico foi removido utilizando um rotoevaporador, operado a 40 °C e 100 RPM, resultando na obtenção de um filme lipídico fino sobre as paredes do fundo do balão de vidro. O balão foi armazenado em um dessecador de sílica gel de um dia para outro (overnight), objetivando remover traços eventualmente remanescentes do solvente orgânico, assim como evitar a degradação do filme lipídico formado pela umidade do ar.

Para produção dos lipossomos de nisina e lipossomos brancos (controle), os filmes foram hidratados com 4 mL de solução de nisina tamponada 2,5 mg/mL

(totalizando 10 mg de nisina por balão) e 4 mL de tampão fosfato 0,01 M; pH 6,4, respectivamente.

A solução de lipossomos foi imediatamente submetida a cinco repetições do ciclo homogenizador, constituído pela agitação vigorosa da solução de lipossomos em banho termostático a 60 °C durante 1 min, seguida da agitação em vórtex à temperatura ambiente por 1 min e repouso à temperatura ambiente por 1 min.

A seguir a solução de lipossomos foi submetida a cinco repetições do ciclo de redução de tamanho, o qual é constituído pela sonicação por 1 min, com equipamento tipo sonda 20 kHz, configurado em 50W de potência, sinal pulsado tipo F, resfriado em gelo, sendo cada ciclo intercalado por 15s de repouso, também resfriado em gelo.

Finalmente, a solução de lipossomos resultante foi filtrada através de um filtro de seringa, malha 0,22 µm, retendo lipossomos com diâmetro superior a esta dimensão, que eventualmente existam na solução.

3.3 Caracterização dos lipossomos

A caracterização de cada um dos lotes de lipossomos preparados, de acordo com proposto por MALHEIROS et al. (2010b), foi realizada através da determinação do diâmetro, índice de polidispersão, potencial Zeta e eficiência de encapsulação. Particularmente esta última foi realizada apenas para os lotes de lipossomos de nisina, uma vez que o ensaio depende do efeito antimicrobiano para sua realização e nenhum efeito antimicrobiano é esperado nos lipossomos brancos.

A) Diâmetro e índice de polidispersão (IPD):

Para caracterização do diâmetro da partícula deve ser valorizado o uso do diâmetro predominante em detrimento do diâmetro médio, uma vez que na maioria das situações sequer existem partículas com o valor do diâmetro médio na solução, sendo portanto, um valor puramente conceitual.

Quanto ao índice de polidispersão, tem por objetivo proporcionar uma avaliação inicial da distribuição de diâmetros dentro da população de partículas. Uma possível classificação da população em função dos valores de IPD é apresentada na Tabela 14.

Tabela 14 – Classificação das populações de partículas conforme valores do índice de polidispersão. Fonte: ZUIDAM et al. (2003)

IPD	População
0 - 0,05	monodispersa
0,05 - 0,08	quase-monodispersa
0,08 - 0,3	baixa polidispersividade
0,3 - 0,6	média polidispersividade
>0,6	alta polidispersividade

No presente trabalho, tanto o diâmetro como o índice de polidispersão foram determinados através da metodologia de Espalhamento de Luz Dinâmica (DLS), utilizando o equipamento Zetasizer nano S90. A metodologia consiste essencialmente em medir por uma técnica interferométrica a laser a difusão das partículas que se movem sob movimento browniano e converter essa medida em tamanho e em distribuição de tamanhos utilizando a relação de Stokes-Einstein (MALVERN PANALYTICAL, 2012). A fim de evitar a saturação da leitura pelo equipamento, amostras de 10 µL da solução de lipossomos foram diluídas em 10 mL de água. Tendo em vista que a presença de partículas em suspensão na água afetaria a leitura realizada, foi utilizada água ultrapura (Milli-Q) para esta finalidade.

B) Potencial zeta:

O potencial Zeta é usado para caracterizar a resultante do campo elétrico na superfície do lipossomo, decorrente das diversas cargas que compõem o mesmo. Para estabilização do lipossomo na solução coloidal apenas por efeito da carga elétrica é recomendado a obtenção de um potencial Zeta, em módulo, igual ou superior a 30 mV. Caso contrário os lipossomos não apresentarão forças de repulsão suficientes para evitar a agregação entre as partículas e consequente precipitação. A estabilidade de uma suspensão coloidal pode ser acompanhada

pelo monitoramento do diâmetro e índice de polidispersão ao longo do tempo (ZUIDAM et al., 2003; POPOVSKA et al., 2013).

O valor foi determinado através da metodologia de Espalhamento de Luz Eletroforética, utilizando o equipamento Zetasizer nano Z. A metodologia consiste essencialmente na aplicação de um campo elétrico à dispersão de partículas, que passarão a se deslocar com uma velocidade diretamente proporcional a sua carga elétrica (potencial Zeta). Essa velocidade é medida por uma técnica interferométrica a laser patenteada, denominada espalhamento de luz com análise de fases (M3 PALS). Os dados são processados via software para cálculo do potencial Zeta (MALVERN PANALYTICAL, 2012). Para evitar a saturação da leitura pelo equipamento, amostras de 10 µL da solução de lipossomos foram diluídas em 10 mL de água. Tendo em vista que a presença de íons em suspensão na água afetaria a leitura realizada, foi novamente utilizada água ultrapura para esta finalidade.

C) Eficiência de encapsulação:

A eficiência de encapsulação define o percentual da substância que efetivamente foi incorporada ao lipossomo, seja em seu núcleo aquoso, seja na própria membrana lipídica.

Conforme metodologia descrita por MALHEIROS et al. (2010c), foram retiradas alíquotas de 400 µL de cada um dos lotes de lipossomos de nisina produzidos. A nisina encapsulada foi separada da nisina não-encapsulada eventualmente existente, utilizando um filtro de centrífuga com ponto de corte 50 kDa, numa centrífuga Eppendorf por 30 min, a 4 °C e 8.000 RPM. Como descrito anteriormente, a molécula de nisina tem cerca de 3,5 kDa de massa molecular, enquanto um lipossomo carregado com nisina tem massa molecular muito superior a 200 kDa. Assim, a utilização de um filtro de 50 kDa permite a retenção de todos os lipossomos da amostra, porém, com separação da nisina livre eventualmente existente.

Utilizando solução salina 0,85%, foi realizada uma diluição seriada do filtrado resultante, desde 1:2 até 1:64. Uma alíquota de 10 µL de cada diluição foi pipetada sobre uma placa de Petri previamente preparada com meio ágar BHI,

sobre o qual havia sido realizada semeadura por distensão (ou espalhamento) de *L. monocytogenes*. A placa foi incubada em estufa a 37 °C. A eficiência de encapsulação foi determinada através da comparação da formação de zonas de inibição de crescimento com uma escala de referência, produzida através de diluições seriadas da solução tamponada de nisina livre 2,5 mg/mL.

Por todo acima exposto, tendo em vista o objetivo do presente trabalho estar relacionado à aplicação na conservação de alimentos, foi definida a preparação de lipossomos com as seguintes características:

- Lipossomos unilamelares grandes (LUVs);
- Preferencialmente diâmetros na faixa de 100 nm;
- Dispersão de diâmetros tão baixa quanto possível;
- Potencial Zeta preferencialmente igual ou superior a 30 mV em módulo;
- Incorporação obrigatória de 100% da nisina livre utilizada durante a preparação;
- Bicamada lipídica constituída exclusivamente por fosfatidilcolina, ou seja, sem a utilização de colesterol ou qualquer outro estabilizante;
- Ausência de funcionalização da membrana lipossômica através da adição de proteínas ou polissacarídeos.

3.4 Produção das amostras

As cepas de *L. monocytogenes* foram cultivadas em erlenmeyers, utilizando meio BHI líquido (Kasvi), incubados em câmara de incubação com agitação orbital (shaker), a 25°C e 125 RPM.

Inicialmente foi realizado o levantamento da curva de crescimento de *L. monocytogenes* sem o emprego de nisina, através da espectrofotometria em 600 nm, objetivando determinar o ponto mais adequado para adição da bacteriocina nas demais condições experimentais. Para tal, a partir do instante da inoculação do microrganismo, foram amostradas 13 alíquotas em intervalos de 1h. Além disso, uma vez que os lipossomos aumentam a turbidez do meio, alterando portanto as leituras realizadas através da espectrofotometria, o levantamento da

curva de crescimento nestas condições experimentais, necessita ser realizado através de plaqueamento e contagem de UFC. Assim, objetivando o estabelecimento de uma correlação entre os dados obtidos por ambas metodologias, também foram amostradas e plaqueadas 13 alíquotas em intervalos de 1 h a partir do instante da inoculação do microrganismo, para levantamento da curva de crescimento do cultivo sem a utilização de nisina através da contagem de UFC.

O plaqueamento foi realizado em meio ágar BHI (Kasvi), subdividindo a placa de Petri em 6 setores, permitindo assim o plaqueamento de 2 diluições e 3 replicatas técnicas em cada *time-point*. As diluições foram realizadas utilizando solução salina 0,85% e as placas foram incubadas em estufa bacteriológica, a 37°C.

A seguir, considerando-se o ponto definido para a adição da bacteriocina, foram determinadas por espectrofotometria, as curvas de crescimento de *L. monocytogenes* com adição de diferentes concentrações de nisina livre, com objetivo de definir as concentrações a serem utilizadas no trabalho para adição do CAMP na forma livre e encapsulado nos lipossomos. Para tal, foram realizados cultivos com concentrações de 0.1, 1, 10 e 100 mg/L de nisina e amostradas alíquotas aos 5, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 150 e 180 min após a adição da bacteriocina. As curvas levantadas foram expressas em termos de UFC/mL utilizando-se o fator de conversão obtido.

Particularmente para a adição de nisina livre, foram definidas 2 concentrações distintas para realização da extração de RNA, a fim de permitir a verificação da expressão diferencial dos genes selecionados, como consequência de efeito dose-dependente. Importante ressaltar que para a adição de nisina na forma nanoencapsulada foi utilizada apenas uma destas concentrações.

Definidas as concentrações a serem utilizadas, para cada concentração foram cultivadas 3 replicatas biológicas nas mesmas condições descritas acima e realizada a extração de RNA aos 5, 30, 60, 120 e 300 min após a adição da nisina livre.

Por fim, também considerando-se o ponto definido para a adição da bacteriocina e a concentração de nisina a ser utilizada no restante do estudo, foi

realizado por meio de contagem de UFC, o levantamento das curvas de crescimento de *L. monocytogenes* com adição do lipossomo branco e do lipossomo de nisina, objetivando verificar possíveis alterações no efeito inibitório da nisina. Para tal, após a adição dos lipossomos, foram amostradas 4 alíquotas em intervalos de 1 h.

Em consonância com as extrações realizadas no cultivo com nisina livre, foram cultivadas 3 replicatas biológicas para cada tipo de lipossomo, nas mesmas condições descritas acima e realizada a extração de RNA aos 5, 60, 120 e 300 min após a adição dos lipossomos. Não foi possível realizar a extração aos 30 min, devido à sobreposição de atividades integrantes do protocolo de extração iniciado aos 5 min após a adição.

Importante salientar que em razão da disponibilidade de arranjo na placa de PCR, para cada uma das amostras (triplicata biológica e *time-point* de extração), foram utilizadas para realização do PCR, triplicatas técnicas, no caso das condições experimentais com nisina livre e quadruplicatas técnicas, no caso das condições experimentais com lipossomos. Assim, para a correta identificação de cada amostra de RNA extraído, foi necessária a adoção de um código de 4 dígitos no presente trabalho, o qual é apresentado na Figura 38, uma vez que sua compreensão será necessária para a interpretação de diversos resultados apresentados no capítulo 4.

Todas as plotagens e funções obtidas por regressão, apresentadas na seção de Resultados do presente trabalho, foram obtidas através do programa Microsoft Excel.

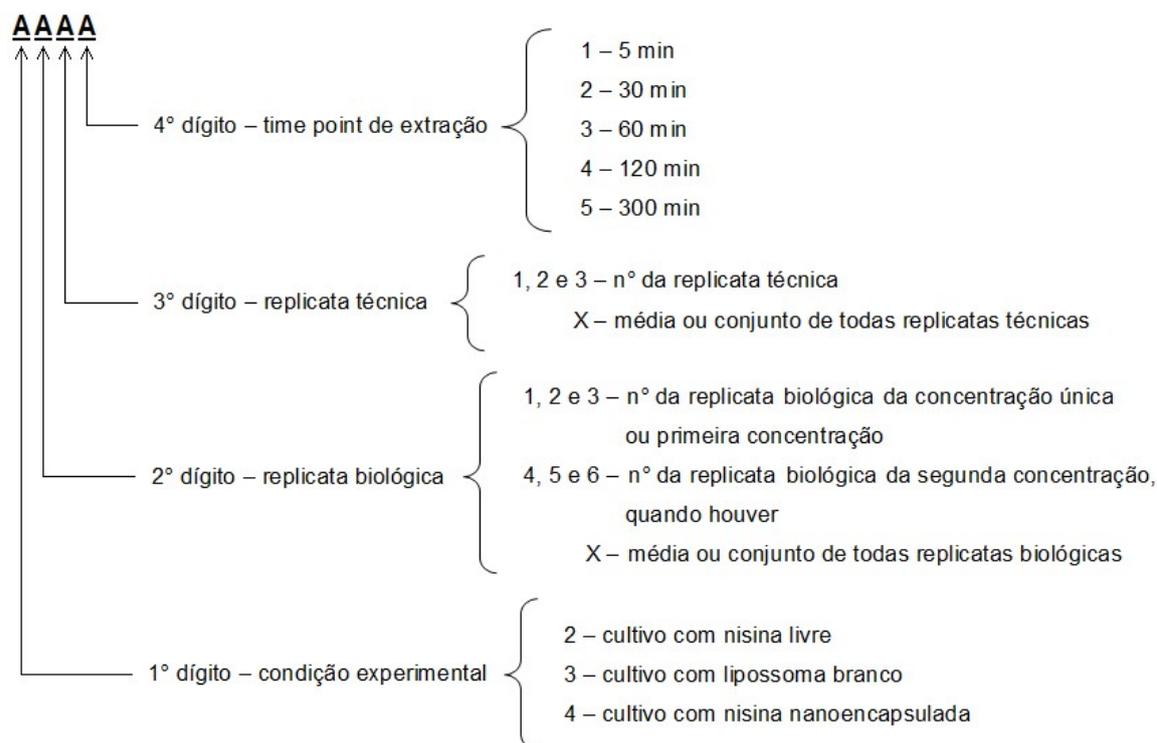


Figura 38 – Código utilizado para identificação de amostras. Fonte: O autor

3.5 Extração do RNA

Inicialmente, com objetivo de aumentar a concentração de RNA total ao término da extração, procedeu-se a retirada de uma alíquota de 10 mL dos cultivos, em cada *time-point* de extração, as quais foram centrifugadas a 5.000 g por 5 min a 4°C, resultando na formação de um pellet de células visível. O pellet foi então suspenso em 250 µL do próprio sobrenadante, sendo o restante do sobrenadante descartado.

A extração de RNA das amostras foi realizada utilizando o reagente Trizol (Invitrogen), conforme protocolo do fabricante. O protocolo se baseia no consagrado trabalho de CHOMCZYNSKI & SACCHI (1987), posteriormente aperfeiçoado por CHOMCZYNSKI & SACCHI (2006), o qual utiliza como princípio o fato do RNA, diferentemente do DNA e das proteínas, permanecer solúvel na fase superior aquosa ácida, após a centrifugação do lisado celular com uma mistura de isotiocianato de guanidina, fenol e clorofórmio. Além disso, conforme o Real Time PCR Handbook (2016), a mistura de isotiocianato de guanidina e fenol

também é responsável por causar a ruptura das células e dissolver os componentes celulares, enquanto o isotiocianato de guanidina mantém a integridade dos ácidos nucleicos protegendo-os das RNases endógenas. Após a separação da fase de interesse, o RNA pode ser recuperado através da precipitação promovida pela adição de isopropanol, a qual por vezes é inclusive visualizada como a formação de uma nuvem esbranquiçada descendente. Por fim, é realizada a centrifugação e descarte do isopropanol, lavagem do RNA em etanol 75% e ressuspensão final em água ultrapura (Milli-Q).

Após extração, foram retiradas alíquotas de 2 µL de todas as amostras, para quantificação das concentrações de RNA e verificação da qualidade da extração através de espectrofotometria NanoDrop. A qualidade da extração foi verificada através da razão entre as absorvâncias UV a 260 nm e 280 nm, a qual conforme o Real Time PCR Handbook (2016), para uma amostra de RNA deve idealmente situar-se entre 1,8 e 2,0. Razões abaixo de 1,8 sugerem a presença de contaminação por proteínas, o que pode reduzir a eficiência da reação de PCR. Outro controle bastante útil consiste na razão entre as absorvâncias a 260 nm e 230 nm, permitindo avaliar a presença de componentes como guanidina, fenol ou etanol, os quais possuem efeito inibitório sobre as reações enzimáticas de transcrição reversa e PCR.

Todas as amostras produzidas foram armazenadas em ultrafreezer (-80°C).

Oportuno ressaltar que toda a água utilizada na extração de RNA e protocolos subsequentes foi previamente tratada com dietil pirocarbonato (DEPC) 1:1.000 (v/v) objetivando torná-la isenta de RNases. Após tratamento, a água foi autoclavada por 15 min a 120°C, com objetivo de degradar todo o DEPC, evitando assim qualquer influência posterior deste sobre as reações de PCR.

3.6 Projeto dos primers

Além dos genes diretamente relacionados aos mecanismos de resistência à nisina, denominados genes de interesse, também faz-se necessário o desenvolvimento de primers para outros genes, denominados genes

normalizadores (ou genes de referência), necessários à realização da técnica de qPCR.

Para esta finalidade, usualmente são utilizados genes *housekeepings* (também chamados de constitutivos), os quais são responsáveis pela manutenção das funções celulares básicas, sendo expressos em taxas relativamente constantes, mesmo sob diferentes condições experimentais, fato que permite correlacionar seu nível de expressão com a carga bacteriana da amostra ou com o *input* de DNA total numa Reação em Cadeia de Polimerase, por exemplo. Por esta razão, são utilizados para a normalização dos dados obtidos para os genes de interesse.

No presente trabalho, foram selecionados um total de 4 genes *housekeepings* de *L. monocytogenes*, candidatos a gene de referência:

16S rRNA – Codifica a subunidade 16S do ribossomo. Foi utilizado como gene de referência para qPCR relativo no trabalho de WERBROUCK et al. (2007). Salienta-se que embora o gene em questão seja tradicionalmente utilizado na literatura científica para esta finalidade, têm sido encontradas muitas críticas ao seu emprego;

rpoD – Codifica o fator sigma da RNA polimerase, necessário ao início da transcrição. Foi utilizado como gene de referência para qPCR relativo nos trabalhos de VAUCHER et al.(2016) e VAUCHER et al. (2017);

rpsI – Codifica proteína ribossomal S9 da subunidade 30S do ribossomo e *infA* – Codifica o fator de iniciação da tradução IF-1. Embora o trabalho de CAMEJO et al. (2009), tenha determinado o transcriptoma da infecção de *L. monocytogenes* em fígado de ratos através da tecnologia microarray, não utilizando portanto, a metodologia de qPCR, ambos os genes foram selecionados a partir do material suplementar S-6, como sendo genes constitutivos com potencial para utilização como gene de referência para qPCR.

Importante salientar que ao longo do presente estudo será identificado qual dos genes *housekeepings* apresentados ou qual combinação deles, constituirá a

melhor normalização possível para as amostras produzidas, justificando desta forma a utilização do termo “candidato”.

No tocante ao projeto dos primers, uma vez que o qPCR foi realizado utilizando-se o método de detecção através de corante fluorescente intercalante ao DNA (SybrGreen), *a priori*, somente se fez necessário o desenvolvimento de um par de primers *forward* e *reverse* para cada gene de interesse, não sendo necessário portanto, o desenvolvimento de sondas fluorescentes (Taqman) para o escopo do presente trabalho. Estes primers foram projetados através da ferramenta primer-blast disponibilizada pelo National Center for Biotechnology Information (NCBI).

Porém, conforme descrito no trabalho de GADKAR & FILION (2013), faz-se ainda necessário considerar que em Procariotos, a congruência da sequência do gDNA e do cDNA obtido após a transcrição reversa do RNA, torna o gDNA um alvo para os primers de qPCR, resultando num aumento artificial da quantificação da expressão gênica. Com objetivo de evitar tal distorção, usualmente é realizado o tratamento das amostras previamente à amplificação com múltiplas rodadas de DNase I, a fim de eliminar quaisquer vestígios de gDNA carregado. Porém, a inativação da DNase I se faz através da desnaturação térmica da enzima, incubando a amostra a 65-70°C por 5-10 min, o que inevitavelmente também acaba por degradar uma parcela do RNA presente na amostra, ainda mais se tratando de RNA bacteriano, o qual sabidamente é extremamente lábil, resultando assim numa redução artificial da quantificação da expressão gênica.

Assim, com o objetivo de possibilitar uma amplificação confiável do cDNA, mesmo na presença de gDNA, sem necessidade de nenhum tratamento prévio com DNase I, foi desenvolvido por GADKAR & FILION (2013), uma técnica engenheirada baseada no uso de primers de transcrição reversa tagueados, os quais possuem uma sequência âncora na extremidade 5', resultando assim na síntese de cDNAs com esta mesma sequência âncora em suas extremidades 5'. Desta forma, utilizando um primer *forward* específico para o alvo e um primer *reverse* específico para a sequência âncora, somente os cDNAs são amplificados, mesmo na presença do gDNA correspondente. Um resumo esquemático comparando o RT-qPCR convencional, incluindo três rodadas de DNase I, com o

RT-qPCR livre de DNase, utilizando apenas primers tagueados (DNF-RT-qPCR), é apresentado na Figura 39.

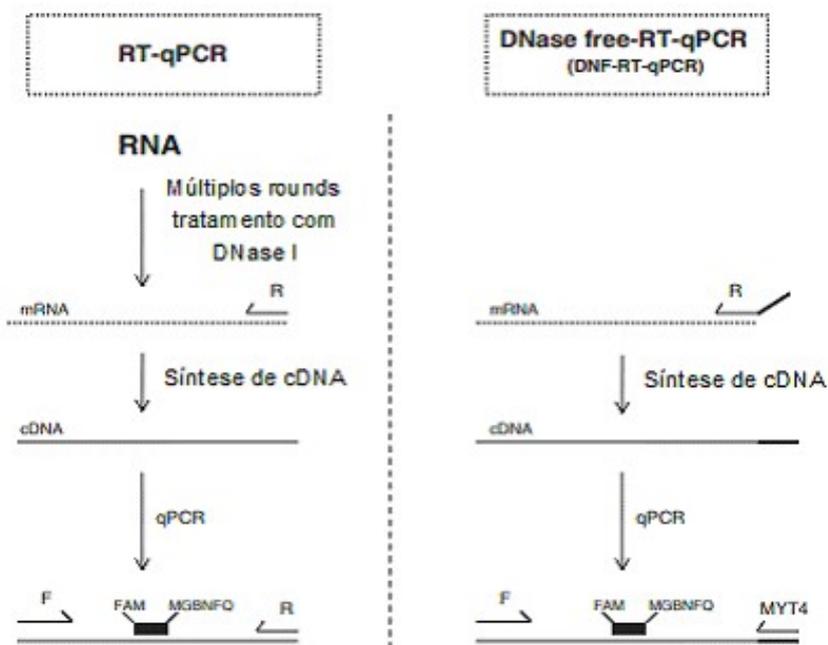


Figura 39 – Esquema comparativo entre RT-qPCR e DNF-RT-qPCR . Fonte: Adaptada de GADKAR & FILION (2013)

Para tal, GADKAR & FILION (2013), selecionaram como sequência âncora, dentre um pool de sequências curtas de DNA sintético, a sequência MYT4 (5'-CAGCTTGGTAGAATCGATCAGCTAC-3'), por não ter demonstrado nenhuma interferência significativa no funcionamento dos primers projetados, assim como possuir homologia muito baixa com qualquer sequência cadastrada no banco de dados GenBank.

Desta forma, no presente trabalho, objetivando a obtenção de resultados análogos, em todos os primers reversos projetados foi acrescentada na extremidade 5' a sequência âncora MYT4, para utilização na transcrição reversa e nas reações de amplificação por PCR utilizado como primer reverso exclusivamente o primer para esta sequência âncora.

3.7 Transcrição reversa

O objetivo da reação de transcrição reversa consiste na produção de uma molécula de DNA complementar (cDNA), ou seja, um DNA sintetizado a partir de uma molécula de RNA mensageiro, diferindo da molécula de DNA original pelo fato dos íntrons já terem sido removidos. Vale ressaltar que não há a presença de outras diferenças estruturais importantes na molécula sintetizada, tais como a presença de riboses ou uracilas, uma vez que após a síntese da primeira fita de cDNA utilizando a molécula de mRNA como molde, a transcriptase reversa degrada a fita de mRNA e sintetiza uma segunda fita de cDNA (Real Time PCR Handbook, 2016).

Para tal, inicialmente os primers (Thermo Fisher) foram suspensos em volumes adequados de tampão TE, para obtenção de uma concentração padronizada de 100 μM . A seguir foi preparado um mix de primers, adicionando-se 10 μL de cada um dos 14 primers *reverse* suspensos, em água ultrapura (Milli-Q) q.s.p. 200 μL , resultando assim numa concentração final de 5 μM para cada primer.

A seguir, em cada tubo de reação foram adicionados um volume de amostra correspondente a 1 μg de RNA total, 4 μL do mix de primers e água ultrapura (Milli-Q) q.s.p. 21 μL . Os tubos foram incubados no termociclador de PCR convencional a 70 $^{\circ}\text{C}$ por 5 min e resfriados em banho de gelo.

Em seguida foram adicionados em cada tubo de reação 6 μL de tampão M-MLV 5X (Invitrogen), 2.5 μL de mix de dNTPs 5 mM (Ludwig Biotecnologia) e 0.5 μL da enzima transcriptase reversa M-MLV 200U/ μL (Invitrogen), totalizando assim um volume de reação de 30 μL . Por fim, os tubos foram incubados no termociclador de PCR convencional a 42 $^{\circ}\text{C}$ por 1 h para realização da transcrição reversa.

As soluções de cDNA produzidas foram diluídas 1:10 para obtenção de uma solução estoque e 1:100 para obtenção de uma solução de trabalho.

3.8 PCR quantitativo

3.8.1 Equipamentos, reagentes e protocolo utilizado

Para a realização do presente trabalho, foi utilizado um termociclador marca Applied Biosystems, modelo 7500 Real Time PCR System, utilizando a versão 3.0 do respectivo software. A programação do termociclador foi composta por:

A) Um estágio inicial, executado uma única vez, objetivando a desnaturação completa do molde de cDNA e a ativação térmica da enzima Taq DNA polimerase (hot start), constituído pela elevação e permanência da temperatura em 94 °C por 5 min.

B) Um segundo estágio, executado 40 vezes, o qual configura propriamente o ciclo de amplificação por PCR, constituído por 4 passos. O primeiro deles consiste na desnaturação, caracterizada pela elevação e permanência da temperatura em 94 °C por 15 s para separação da dupla fita do DNA molde em duas fitas simples. O segundo passo consiste no anelamento, hibridização ou hibridação, caracterizada pela redução e permanência da temperatura em 60 °C por 10 s para que os primers possam se ligar às fitas simples. O terceiro passo consiste na extensão ou polimerização, caracterizado pela elevação e permanência da temperatura em 72 °C por 15 s, para a síntese de DNA dupla fita pela enzima Taq DNA polimerase, a partir dos primers anelados, utilizando as fitas simples como molde. E o último passo consiste na redução e permanência da temperatura em 60 °C por 35 s para realização da leitura de fluorescência.

C) Um último estágio, executado uma única vez, para determinação da curva de dissociação ou curva de *melting*, constituído por 3 passos. Os dois primeiros consistindo numa última desnaturação e anelamento, este último porém, com duração de 1 min, para assegurar que todas as sequências estejam perfeitamente aneladas e um terceiro passo, no qual a temperatura é lentamente

elevada até 95 °C, a uma taxa 0,3 °C/s, com objetivo de permitir a obtenção da curva de *melting*.

Oportuno ressaltar que as temperaturas de ativação, desnaturação e extensão adotadas são estritamente as recomendadas pelo fabricante da enzima. Já a temperatura de anelamento, foi definida em 5 °C abaixo da menor temperatura de *melting* calculada para os primers envolvidos na reação, conforme recomendação do Real Time PCR Handbook (2016). As durações recomendadas pelo fabricante também foram otimizadas (reduzidas), em razão da grande quantidade de placas a serem analisadas e existência de demanda de uso do equipamento em outros projetos de pesquisa.

O protocolo completo da programação do termociclador pode ser visualizado na Figura 40.

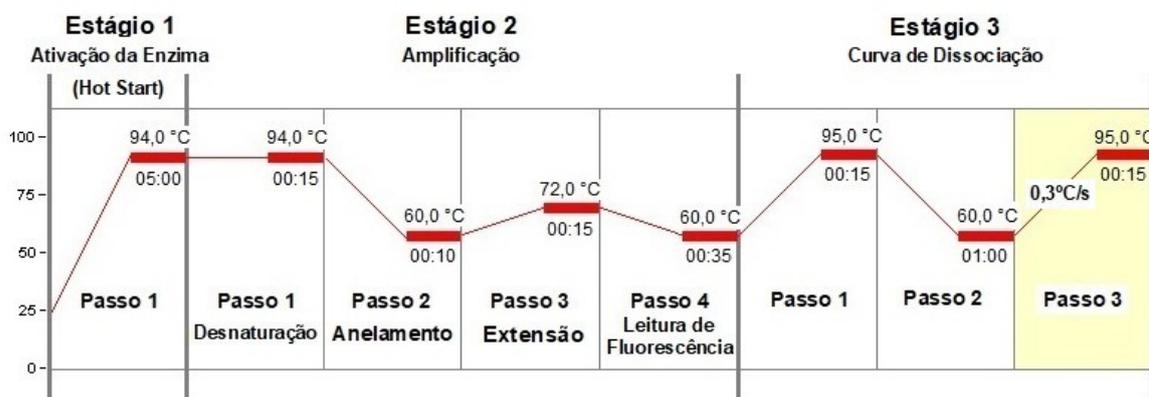


Figura 40 – Diagrama da programação completa utilizada no termociclador. Fonte: APPLIED BIOSYSTEMS (2011)

No presente trabalho foi utilizada a enzima Platinum Taq DNA Polimerase (Invitrogen). Comparativamente a Standard Taq DNA polimerase, são salientadas três principais diferenças em THERMO FISHER SCIENTIFIC (2020): Primeiramente, a enzima se encontra inativada através da presença de anticorpos monoclonais termolábeis, até que ocorra o passo inicial no termociclador (hot start), prevenindo assim o alongamento inespecífico à temperatura ambiente de primers eventualmente anelados. A segunda diferença é que a enzima é DNA free, ou seja, livre da contaminação de DNA, possuindo assim maior sensibilidade

para detecção de alvos com abundância muito baixa (por exemplo 1 cópia). Por fim, a enzima possui uma elevada especificidade, capaz de assegurar a ausência de falsos positivos em controles negativos.

Os corantes fluorescentes constituem outro reagente de fundamental importância para realização da técnica de qPCR, podendo ser classificados, conforme o Real Time PCR Handbook (2016), essencialmente em dois grupos:

A) Corantes fluorescentes intercalantes ao DNA (SybrGreen por exemplo): Sistema constituído por um corante fluorescente, o qual possui afinidade pela dupla fita de DNA, se intercalando ao longo da mesma, emitindo fluorescência relevante apenas nesta condição. Assim, considerando que os amplicons têm o mesmo comprimento, ao final de cada passo de extensão, teoricamente o sinal de fluorescência será diretamente proporcional ao número de amplicons existentes, conforme demonstrado na Figura 41;

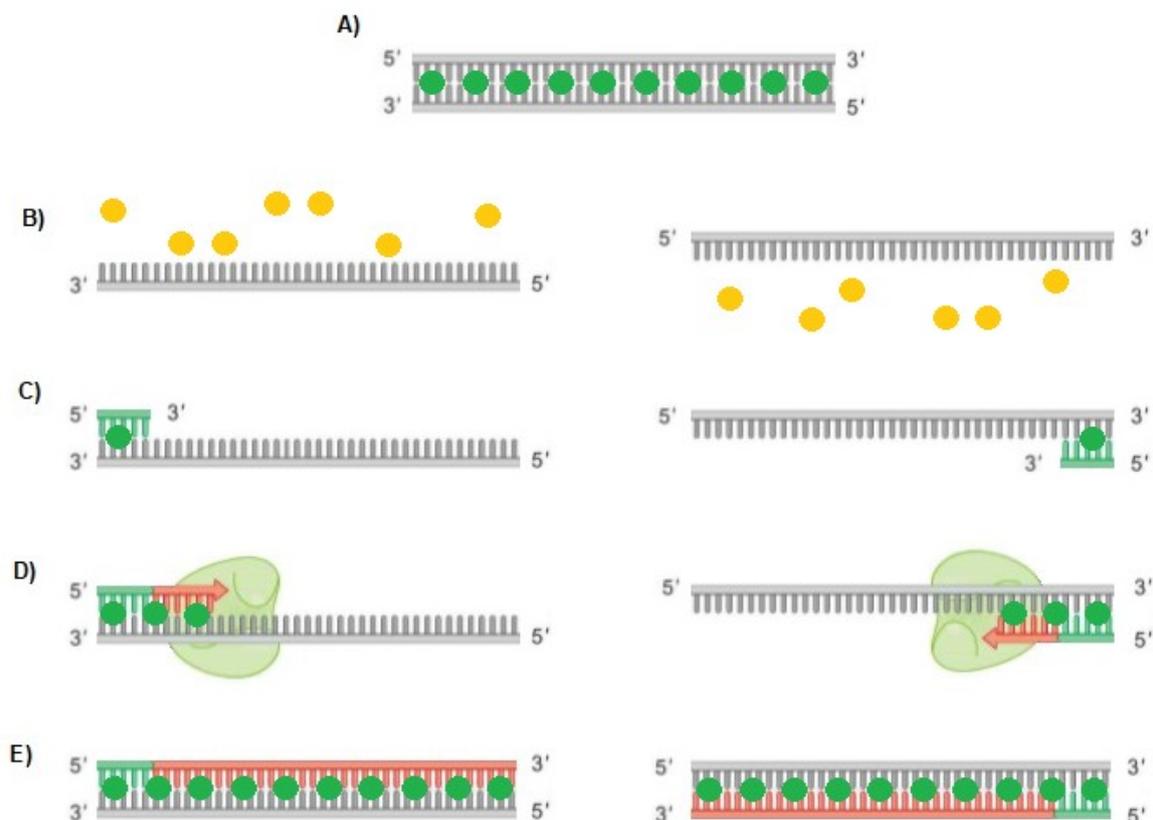


Figura 41 – Comportamento do corante SybrGreen durante o ciclo de amplificação do qPCR. Amplicon disponível no início do ciclo (A), desnaturação (B), anelamento (C), extensão (D) e amplicons produzidos ao término do ciclo (E). Fonte: O autor

B) Sondas fluorescentes (TaqMan por exemplo): Sistema constituído por um oligonucleotídeo denominado sonda ou probe, contendo um corante fluorescente denominado repórter na extremidade 5' e uma substância absorvedora denominada silenciador ou quencher na extremidade 3'. Enquanto a sonda está intacta, a proximidade do quencher reduz bastante a fluorescência emitida pelo corante reporter através do fenômeno de transferência de energia por ressonância de fluorescência (FRET). Uma vez presente a sequência alvo na fita molde da amostra, ocorrerá o anelamento da sonda a esta e durante o passo de extensão, reporter e quencher serão clivados através da atividade 5' nuclease da Taq DNA polimerase. Com isso cessa de forma definitiva o silenciamento do reporter pelo quencher. A atividade da DNA polimerase prossegue sem inibição através da sonda clivada e o número de reporters emitindo fluorescência será diretamente proporcional ao número de amplicons produzidos.

No presente trabalho, em razão da necessidade de uso otimizado dos recursos financeiros, acrescida da elevada especificidade dos primers tagueados que foram empregados, considerou-se adequada e suficiente a utilização do corante fluorescente SyberGreen.

Também alinhado ao mesmo objetivo, o mix de PCR foi preparado no próprio Laboratório de Genomas e Populações de Plantas (LGPP) da UFRGS, local de realização do PCR. Com exceção do SybrGreen (Roche), dos dNTPs (Ludwig Biotecnologia) e da água ultrapura, obtida em purificador Milli-Q no Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos (ICTA) da UFRGS, todos os demais reagentes que integram o mix são de fornecimento Invitrogen. As concentrações e volumes utilizados em cada poço podem ser visualizados na Tabela 15.

Ainda imbuído do uso racional e otimizado dos recursos financeiros, o volume total de reação foi reduzido de 50 µL (recomendado pelo fabricante da enzima) para 20 µL (10 µL de amostra e 10 µL de mix de PCR). Além disso, o volume de enzima foi reduzido em 37,5% e o volume de MgCl₂ aumentado em 100%, em relação às proporções recomendadas pelo fabricante, aumentando assim o aproveitamento da capacidade enzimática da Taq DNA polimerase.

Tabela 15 – Composição de reagentes (amostra e mix de PCR) utilizados em um poço de reação. Fonte: O autor

Reagentes	V_{utiliz} (µL)
Amostra	
cDNA 1:100	10,00
Mix PCR	
Milli-Q q.s.p. 10 µL	3,95
Tampão 10X	2,00
MgCl ₂ 50 mM	1,20
dNTPs 5 mM	0,40
Mix primers (F+R all) 10 µM	0,40
SybrGreen 1X	2,00
Platinum Taq DNA Polimerase 5 U/mL	0,05
Total	20,00

Uma vez que no presente trabalho dispúnhamos de 76 amostras distintas a serem pesquisadas a expressão de 14 genes em cada uma delas, a realização de um processo de otimização da reação de PCR, individualmente para cada condição amostra/gene, se tornaria extremamente laboriosa, inclusive indisponibilizando o termociclador para realização de outras pesquisas por longo período. Desta forma, os parâmetros acima informados foram utilizados para todas as reações de amplificação realizadas no presente estudo e posteriormente verificada a eficiência de amplificação resultante.

Para reduzir o erro experimental e facilitar a operação de pipetagem, procurou-se alocar todas as replicatas relativas a um mesmo gene, numa mesma placa, sempre que possível. Em razão disso, a pipetagem do mix de PCR tornou-se idêntica para todos os poços de uma mesma placa, diferindo apenas a pipetagem das amostras. Assim, optou-se em realizar primeiramente a pipetagem das amostras, já que a primeira pipetagem permite um controle visual muito maior do processo. Outro motivo para escolha desta sequência foi objetivando uma melhor preservação do SybrGreen e da Taq DNA Polimerase, deixando-se para pipetar o mix de PCR mais próximo do momento de colocação da placa no termociclador.

Após o término da pipetagem foi realizada a selagem das placas com microselo adesivo e as mesmas foram submetidas a um spin em centrífuga, a 1.000 RPM por 1 min, para descida das gotículas eventualmente aderidas à parede dos poços.

Os dados de saída do termociclador (leitura de fluorescência) foram exportados para o formato.xls e tratados matematicamente no Microsoft Excel 2002, para determinação do nível de expressão gênica relativa.

As seções a seguir (caps. 3.8.2 à 3.8.9), tem como objetivo o estudo das principais variáveis envolvidas na quantificação relativa da expressão gênica através da metodologia DNF-RT-qPCR, necessárias a obtenção de resultados consistentes, sendo apresentadas na mesma sequência em que será realizado o tratamento dos dados.

3.8.2 Uso de primers taguados e a eliminação da degradação de mRNA e da contaminação com DNA genômico

Conforme já descrito no item 3.6 do presente trabalho, a utilização de primers taguados adequados na transcrição reversa de mRNAs e na amplificação dos respectivos cDNAs, constitui uma solução racional, econômica, menos laboriosa e totalmente eficaz para evitar a amplificação na reação de PCR, do gDNA eventualmente presente na amostra. Foi demonstrado ainda, que esta solução também evita a degradação de mRNA inexoravelmente associada ao tratamento da amostra com DNase.

Objetivando não somente corroborar com a consolidação destes resultados, mas também de compreender mais detalhadamente como tais fatores impactam o resultado do qPCR, foi realizado um experimento secundário utilizando as amostras e primers produzidos para o presente estudo. Foram selecionadas 3 replicatas biológicas da mesma condição experimental (RNA extraído 5 h após a adição de 100 mg/mL de nisina livre), baseando-se meramente no fato de constituírem dentre todas as amostras, aquelas com maior volume disponível. Um primeiro conjunto constituído por uma alíquota correspondente a 1 µg de RNA total de cada amostra foi submetido ao tratamento com a enzima RQ1 RNase-free DNase (Promega), seguindo protocolo do fabricante (acrescentar q.s.p. 20 µL de água ultrapura Milli-Q, 1 µL RQ1 Buffer 10x, 1 µL da enzima e incubar a 37 °C por 30 min, adicionar 1 µL de stop solution e incubar a 65 °C por 10 min) e subsequentemente à transcrição reversa

utilizando primers convencionais correspondentes aos primers tagueados projetados para uso no presente estudo (primer *forward* idêntico e primer *reverse* sem a sequência tagueadora). Outro conjunto idêntico de alíquotas, foi submetido diretamente à transcrição reversa, sem tratamento com DNase I portanto, utilizando os primers tagueados projetados para uso no presente estudo. Em ambos os casos, a transcrição reversa foi realizada conforme os parâmetros descritos no item 3.7. A concentração de RNA nas alíquotas foi mensurada por espectrofotometria utilizando o equipamento NanoDrop. Foi realizada uma correção relativa às diluições realizadas para que todos resultados se tornassem comparáveis entre si. Todas as alíquotas foram submetidas ao PCR quantitativo, utilizando os parâmetros definidos no item 3.8 do presente trabalho. Foram utilizadas quadruplicatas técnicas. Os resultados relativos ao uso de primers tagueados (não submetidas ao tratamento com DNase I) foram utilizados como situação calibradora e os relativos ao uso de primers convencionais (submetidos ao tratamento com DNase I) foram utilizados como situação questionada, na aplicação da metodologia $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

3.8.3 Definição da *thresholdline* e a redução dos erros associados

Conforme WONG & MEDRANO (2005), a curva de amplificação do PCR pode ser decomposta em 4 fases: linear basal, exponencial inicial, log-linear e platô, as quais estão representadas na Figura 42. O valor de R_n representa a intensidade de fluorescência emitida pelo corante repórter, dividida pela intensidade de fluorescência emitida pelo corante passivo de referência (ROX por exemplo), quando este for utilizado. As principais finalidades de um corante passivo de referência são normalizar o efeito da diferença de volume do mix de PCR, assim como pequenas flutuações no sinal de fluorescência não relacionadas à reação de PCR. Já o valor ΔR_n é calculado como a diferença entre os valores de R_n de uma amostra e um controle negativo, com o objetivo de retirar o ruído de fundo eventualmente presente no sinal, representando portanto, efetivamente a magnitude do sinal gerado durante o PCR.

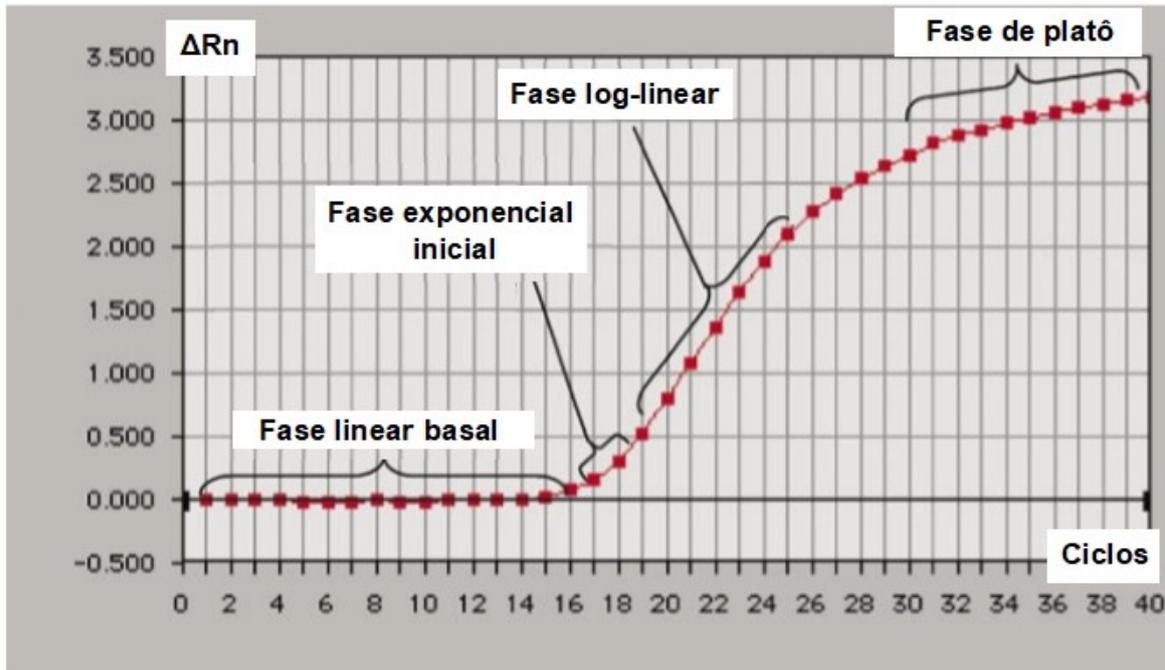


Figura 42 – Fases integrantes da curva de amplificação. Fonte: WONG & MEDRANO (2005)

Conforme Real Time PCR Handbook (2016), a *baseline* ou linha de base da reação de qPCR se refere ao nível de sinal durante os ciclos iniciais do PCR (usualmente 3 a 15), em que há pouca mudança no sinal de fluorescência, sendo portanto, igual ao nível de ruído da reação. Já a *thresholdline* ou linha de limite é um valor de ΔRn arbitrariamente definido, objetivando a determinação do número de ciclos de amplificação sobre a amostra necessários até sua obtenção, possibilitando assim através destas informações, a determinação do número inicial de cópias de DNA na amostra.

É de fundamental importância que a linha de *threshold* intercepte simultaneamente a curva de amplificação de todas as amostras, na fase log-linear, pois é somente nesta região que se encontram simultaneamente atendidos os seguintes requisitos:

- O sinal de fluorescência decorrente da amplificação se torna no mínimo uma ordem de grandeza maior que o nível de ruído, tornando portanto, aceitável a magnitude do erro inserido pelo ruído na leitura;
- O sistema apresenta uma resposta linear (na escala logarítmica), ou seja, independentemente se adotado um valor de *threshold* um pouco maior ou um

pouco menor, haverá alteração correspondente e proporcional no valor de Ct, não alterando o resultado do qPCR;

- Ainda não houve redução na eficiência da Taq DNA polimerase, na disponibilidade de reagentes ou a formação de excesso de produtos amplificados competindo pelos mesmos, como ocorre na fase de platô e pré-platô.

Muitas vezes o valor de *threshold* é definido automaticamente pelo software, utilizando 10 vezes o valor da linha de base ou seja, do nível de ruído inerente à metodologia qPCR. Embora este critério funcione na maioria das situações, é de fundamental importância que os valores de *threshold* automaticamente definidos sempre sejam verificados e se necessário reajustados, antes da extração dos valores de Ct.

Objetivando corroborar com a divulgação da importância da escolha da *thresholdline*, assim como compreender o quanto tal fator possa impactar os resultados do qPCR, no presente estudo, foi realizado um experimento secundário, consistindo na extração de valores de Ct para diferentes valores de *threshold* (2.000, 4.000, 6.000, 8.000 e 12.000), das curvas de amplificação obtidas para 3 replicatas biológicas da mesma condição experimental (RNA extraído 60 min após a adição de 100 mg/L de nisina livre), selecionada em razão da relevância da amostra no presente estudo (principal situação calibradora).

3.8.4 Curvas de *melting* e a detecção de produtos de amplificação indesejados

Conforme descrito no Real Time PCR Handbook (2016), a curva de *melting* ou curva de dissociação, tem como objetivo permitir a visualização da alteração no sinal de fluorescência, ocorrida durante o aumento gradual da temperatura, em razão da dissociação de moléculas de DNA dupla fita associadas aos corantes, em DNA de fita simples. Assim conforme ocorre a elevação da temperatura, aumenta a dissociação, reduzindo de maneira correspondente o sinal de fluorescência. Para construção da curva de *melting*, primeiramente a intensidade de fluorescência é plotada em função da temperatura (F x T), permitindo

subsequentemente que seja plotada a derivada negativa da intensidade de fluorescência (em relação à temperatura) em função da temperatura ($-dF/dT \times T$), o que transforma a curva de *melting* num pico, facilitando muito a visualização. O aspecto característico de ambas as curvas pode ser visualizado na Figura 43.

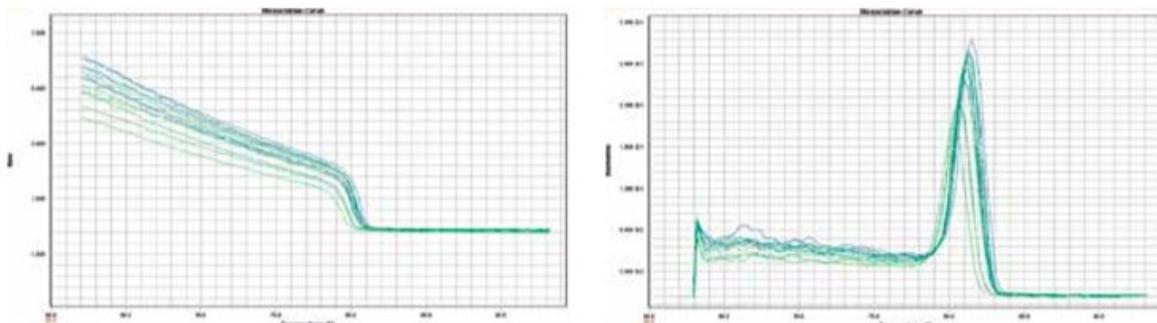


Figura 43 – Aspecto característicos das curvas de *melting* nos formatos FxT (esquerda) e $-dF/dT \times T$ (direita). Fonte: Real Time PCR Handbook (2016)

Conforme ressaltado pelo Real Time PCR Handbook (2016), sistemas que usam sondas fluorescentes não permitem a determinação da curva de *melting*, uma vez que a dissociação ocorrida entre corante e a sonda durante a amplificação possui caráter permanente. Porém, se faz necessário contrapor que os sistemas que empregam tais sondas já possuem robustez suficiente para apenas emitir sinal de fluorescência quando produzido um amplicon específico, mesmo que haja formação de dímeros entre primers e probes na reação. Contudo, embora estes dímeros não influenciem diretamente o sinal de fluorescência, acabam por promover uma competição pelos componentes da reação, o que pode vir a impactar a eficiência de amplificação e indiretamente o sinal de fluorescência. Assim, embora os sistemas de sondas fluorescentes possuam maior especificidade, não estão integralmente isentos de erro na leitura de fluorescência. Adversamente, sistemas que usam corantes fluorescentes que se ligam ao DNA, possibilitam a execução da curva de *melting* após a conclusão dos ciclos de amplificação, sem custo adicional e no próprio poço de reação, apenas acrescentando tempo adicional à programação do termociclador.

Ainda segundo o Real Time PCR Handbook (2016), os principais produtos indesejados na reação de amplificação são a formação de dímeros de primers (a

situação mais comum é entre os primers *forward* e *reverse*, mais também podem ocorrer entre primer e sonda ou até entre primers idênticos), o dobramento do primer sobre si mesmo (auto-dobrimento), a amplificação de produtos inespecíficos (muito semelhantes à sequência alvo) e a contaminação da reação com a própria sequência alvo (por exemplo através do mix de PCR ou enriquecimento da amostra de RNA com gDNA). Oportuno lembrar que além de produzirem um aumento artificial do sinal de fluorescência, nos sistemas que utilizam corantes ligados ao DNA dupla fita, os produtos de amplificação indesejados também promovem uma competição pelos componentes da reação, fato que pode influenciar na eficiência de amplificação.

O conceito envolvido na curva de *melting*, segundo o Real Time PCR Handbook (2016), é que cada sequência de nucleotídeos, possui uma temperatura de *melting* (T_m) específica. Assim, numa amostra onde tenha sido amplificada exclusivamente a sequência-alvo, acaba por resultar na formação de uma curva de *melting* com um único pico, centrado num valor de T_m específico, simétrico e bem definido (livre de ruído e outras anomalias). Desta maneira, a formação de quaisquer produtos de amplificação indesejados, acabam por produzir alterações específicas nas curvas de amplificação e curvas de *melting*, da amostra e do controle negativo, permitindo assim a identificação da sua ocorrência através destes indícios. Uma revisão das principais ferramentas disponíveis para a predição da formação de dímeros de primers ou autodobrimentos, ainda durante a etapa de projeto dos primers, assim como as principais informações disponíveis para detecção da formação de produtos de amplificação indesejados, após realização da reação de PCR e as possíveis correções a serem realizadas, em caso de detecção, é apresentada no Apêndice II - Ferramentas para detecção e prevenção de produtos de amplificação indesejados, do presente trabalho.

No presente trabalho, em razão da necessidade de alocação de todas as replicatas relativas a um mesmo gene, na mesma placa, objetivando a redução do erro experimental, não houve disponibilidade de poços para utilização de controles negativos. Além disso, uma vez que não se dispunha de tempo hábil para o re-projeto e fornecimento de primers adicionais, o resultado das reações

que eventualmente tenham indícios de formação de dímeros de primers, autodobramentos ou amplificação de produtos inespecíficos, foram excluídos do estudo. Por fim, os primers das reações que apresentaram amplificação de produtos indesejados foram reavaliados através do software AUTODIMER versão 2017, a fim de verificar a capacidade de predição do mesmo.

3.8.5 Genes normalizadores

Conforme VANDESOMPELE et al. (2002), os resultados do PCR estão sujeitos a influências não específicas, tais como diferenças de input gênico entre amostras, diferenças de eficiência enzimática entre corridas e diferenças entre os níveis de atividade transcricional de diferentes tecidos, dentre outras. Para retirar o efeito destas influências, os resultados necessitam ser primeiramente normalizados, através dos chamados genes normalizadores, genes de referência ou controle endógeno. Porém, como ressaltado por VANDESOMPELE et al. (2002), os níveis de expressão dos genes candidatos a normalizadores, assim como quaisquer genes de interesse, também estão sujeitos às mesmas influências. Desta forma, para se identificar a suposta estabilidade de um gene candidato a normalizador, haveria a necessidade prévia de outro normalizador, criando assim um problema circular. Para resolução desta que é uma questão crucial à técnica do PCR quantitativo, tem sido propostos diversos algoritmos pelos pesquisadores.

Objetivando demonstrar a importância da escolha do algoritmo de normalização, assim como compreender o quanto tal fator possa impactar os resultados do qPCR, foram comparados os genes normalizadores e resultados obtidos, através dos algoritmos mais comumente utilizados para normalização (Genorm, NormFinder e BestKeeper), considerando-se todo conjunto de dados mantidos no presente estudo. Uma breve descrição e análise de cada um dos algoritmos utilizados é apresentada no Apêndice III - Análise dos principais algoritmos para normalização.

3.8.6 Determinação da eficiência de amplificação e a redução dos erros associados

LIVAK & SCHMITTGEN (2001), ressaltam que reações onde os amplicons tenham sido projetados com até 150 pares de bases e as concentrações de primers e Mg^{2+} tenham sido otimizadas, resultam numa eficiência de amplificação muito próxima de 100%. Porém, conforme WONG & MEDRANO (2005), na prática, mesmo após realização da otimização, a maioria das reações de PCR não possuem as condições ideais, apresentando segundo o Real Time PCR Handbook (2016), eficiências de amplificação compreendidas entre 90 e 110%. Reações com baixas eficiências de amplificação (abaixo de 90%), geralmente têm como principais causas, concentrações sub-ótimas de reagentes (primers, Mg^{2+} e enzima), diferença maior que 5 °C entre a T_m dos primers, competição excessiva por reagentes, condições sub-ótimas do termociclador, amplicons com comprimento ou conteúdo GC excessivo, formação de produtos indesejados, enzima com qualidade ruim, dentre outras. Já reações com eficiência acima de 110% (amplificação de produtos indesejados), estão associadas à presença de inibidores de PCR em um ou mais reagentes. São exemplos bem conhecidos a extração de ácidos nucleicos com o emprego de colunas de sílica, onde sais caotrópicos se ligam ao DNA ou RNA, podendo inibir posteriormente a Taq DNA polimerase. Na extração orgânica, carregadores de fenol e etanol podem ter o mesmo efeito. Além disso, a baixa qualidade do DNA ou RNA, como também uma concentração excessiva da molécula alvo, podem igualmente promover inibição. Contrariamente às reações com baixa eficiência, nas situações em que há presença de inibidores de PCR, a diluição da reação melhora sua eficiência.

Diante do exposto, torna-se necessária a determinação da eficiência de amplificação de cada gene, para correção dos resultados conforme será explicado no cap. 3.8.7, o que é usualmente realizado através de uma curva padrão. Os preceitos teóricos associados à construção e utilização da curva padrão para obtenção da eficiência de amplificação são revisados no Apêndice IV – Utilização de curvas padrão para determinação da eficiência de amplificação.

No caso particular do presente trabalho, a produção de amostras com concentrações conhecidas e confiáveis para construção de curvas padrão, para cada um dos 14 genes envolvidos, demandaria por si só uma quantidade de trabalho muitas vezes maior que para a realização do próprio estudo de alteração do perfil de expressão gênica, com reflexos no orçamento e prazo do projeto, tornando portanto inviável a construção das curvas padrão.

Além disso, conforme ressaltado por PEIRSON et al. (2003), mesmo com todo rigor do protocolo descrito no Apêndice IV, objetivando assegurar uma amostra de composição pura e bem determinada, a curva padrão inevitavelmente irá incorporar algum nível de erro, decorrente das pipetagens, diluição seriada e reação de PCR realizadas após a espectrometria de massas. Mas a principal fonte de erro associada à determinação da eficiência de amplificação através da curva padrão, é que a amostra de concentração conhecida utilizada para sua construção não provém de nenhuma amostra para a qual se deseja calcular a eficiência de amplificação. Correspondem a corridas diferentes, muitas vezes realizadas em dias diferentes, por vezes até em termocicladores diferentes. Frequentemente alguns dos reagentes que compõem o mix de PCR terminam, sendo necessário portanto, a utilização de novos kits e embalagens, por vezes até mesmo de fornecedores distintos. Inclusive os reagentes de uma mesma embalagem sofrem alteração ao longo do tempo, produzindo reflexos na eficiência de amplificação. Além disso, como já descrito acima, até mesmo pequenas variações de pipetagem ocorridas no preparo do mix de PCR, já são suficientes para produzir reflexos na eficiência de amplificação e por fim, a própria amostra possui composição e concentrações diferentes. Fica assim demonstrado, que além de extremamente laboriosa, a utilização da curva padrão para a determinação da eficiência de amplificação possui uma inexatidão inerente ao próprio processo.

Para superar tal limitação, seria necessário que os dados utilizados, fossem provenientes da própria amostra para a qual se deseja calcular a eficiência de amplificação. Os trabalhos de GENTLE et al. (2001), LIU & SAINT (2002) e PEIRSON et al. (2003), propuseram expressões alinhadas a este objetivo, as quais são compiladas na Figura 44.

GENTLE et al. (2001)	LIU & SAINT (2002)	PEIRSON et al. (2003)
$E_x = \frac{1}{\log(\text{slope})}$	$E_x = \left(\frac{\Delta R_{n,B}}{\Delta R_{n,A}} \right)^{-(n_B - n_A)} - 1$	$E_x = 10^{\left(\frac{1}{\text{slope}} \right)} - 1$

Figura 44 – Quadro comparativo entre as expressões para cálculo da eficiência de amplificação. Fonte: GENTLE et al. (2001), LIU & SAINT (2002) e PEIRSON et al. (2003)

Embora infelizmente todas as expressões acima incorporem erros, fato que será demonstrado no cap. 4.5.5, LIU & SAINT (2002), acabam por descrever em seu trabalho uma premissa fundamental: Numa quantificação relativa por PCR, embora não saibamos a quantidade de amplicons existentes ao término de cada ciclo, sabemos que esta quantidade é proporcional à quantidade de fluorescência reportada, fato que permite reescrever a expressão para determinação do número de amplicons relativos a um gene de interesse x, após n ciclos de amplificação, da maneira apresentada na Expressão 1:

$$X_n = X_0(1 + E_x)^n \Rightarrow \Delta R_n = \Delta R_0(1 + E_x)^n \quad \text{Exp. 1}$$

onde:

ΔR_0 é a fluorescência reportada inicial do gene x na amostra;

ΔR_n é a fluorescência reportada do gene x na amostra, após n ciclos de amplificação;

Por sua vez, GENTLE et al. (2001), estabelecem em seu trabalho os alicerces para o desenvolvimento de uma metodologia de cálculo consistente da eficiência de amplificação da reação de PCR, sem a utilização de uma curva padrão, ao sugerir a utilização dos dados de fluorescência reportada *versus* o número de ciclos (raw data) do próprio experimento para esta finalidade. Conforme a metodologia, após identificado os limites da fase log-linear de cada

reação, é construído um gráfico do logaritmo da fluorescência reportada *versus* o número de ciclos, no qual o coeficiente linear da reta obtida guardaria uma relação com a eficiência de amplificação, conforme esquematicamente representado no fluxograma da Figura 45.

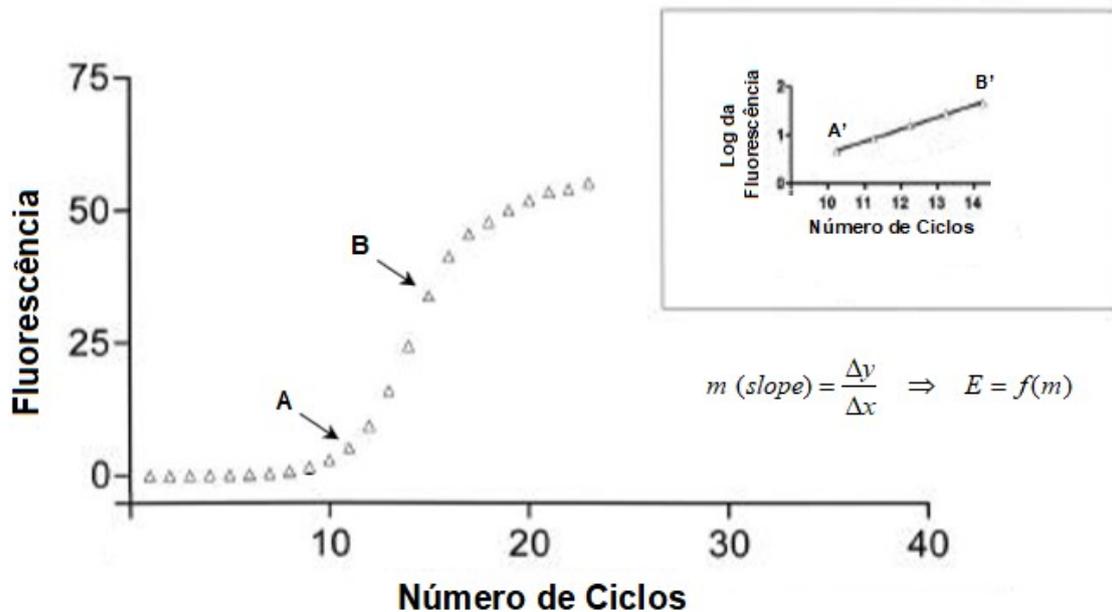


Figura 45 – Fluxograma de um método alternativo para cálculo da eficiência de amplificação, sem a utilização de uma curva padrão. Fonte: Adaptado de GENTLE et al. (2001)

Embora LIU & SAINT (2002), não tenham apresentado em seu trabalho, uma dedução matemática da expressão proposta para sua eficiência de amplificação, apresentaram uma dedução para o método de cálculo proposto para o nível de expressão gênica relativa, a qual pode em parte, ser adaptada como ponto de partida para a dedução da expressão correta a ser realizada no presente trabalho. Assim, para os pontos A e B da Figura 45, podem ser escritas as Expressões 2 a partir da Expressão 1:

$$\begin{cases} \Delta R_{n,A} = \Delta R_0 (1 + E_X)^{n_A} \\ \Delta R_{n,B} = \Delta R_0 (1 + E_X)^{n_B} \end{cases} \text{Exp. 2}$$

Dividindo-se $\Delta R_{n,B}$ por $\Delta R_{n,A}$, obtêm-se a Expressão 3:

$$\frac{\Delta R_{n,B}}{\Delta R_{n,A}} = \frac{\Delta R_0 (1 + E_X)^{n_B}}{\Delta R_0 (1 + E_X)^{n_A}} = (1 + E_X)^{(n_B - n_A)} \text{ Exp. 3}$$

Elevando-se ambos os membros a $\frac{1}{(n_B - n_A)}$, para que a sentença continue verdadeira, obtêm-se a Expressão 4

$$\left(\frac{\Delta R_{n,B}}{\Delta R_{n,A}} \right)^{\frac{1}{(n_B - n_A)}} = \left((1 + E_X)^{(n_B - n_A)} \right)^{\frac{1}{(n_B - n_A)}} \text{ Exp. 4}$$

Lembrando que para resolver uma potência de potência, deve-se conservar a base e multiplicar os expoentes entre si, obtêm-se a Expressão 5:

$$\left(\frac{\Delta R_{n,B}}{\Delta R_{n,A}} \right)^{\frac{1}{(n_B - n_A)}} = (1 + E_X)^{\frac{(n_B - n_A)}{(n_B - n_A)}} = (1 + E_X) \text{ Exp. 5}$$

Assim, isolando-se a eficiência de amplificação, obtêm-se a Expressão 6, que consiste na expressão correta para determinação da eficiência de amplificação diretamente a partir dos dados da fluorescência reportada na reação de PCR:

$$E_X = \left(\frac{\Delta R_{n,B}}{\Delta R_{n,A}} \right)^{\frac{1}{(n_B - n_A)}} - 1 \text{ Exp. 6}$$

onde:

n_A e $\Delta R_{n,A}$ são as coordenadas do ponto A no gráfico não linearizado da Figura 45;

n_B e $\Delta R_{n,B}$ são as coordenadas do ponto B no gráfico não linearizado da Figura 45;

Aplicando a Expressão 6 ao caso particular da determinação da eficiência de amplificação de um único ciclo, obtêm-se a Expressão 7:

$$E_X = \left(\frac{\Delta R_n}{\Delta R_{n-1}} \right)^{\frac{1}{i}} - 1 \Rightarrow \frac{\Delta R_n}{\Delta R_{n-1}} = E_X + 1 \Rightarrow \Delta R_n = \Delta R_{n-1} (E_X + 1) \Rightarrow \Delta R_n = E_X \cdot \Delta R_{n-1} + \Delta R_{n-1} \Rightarrow$$

$$\Rightarrow E_X \cdot \Delta R_{n-1} = \Delta R_n - \Delta R_{n-1} \Rightarrow E_X = \frac{\Delta R_n - \Delta R_{n-1}}{\Delta R_{n-1}} \text{ Exp. 7}$$

Alternativamente, aplicando-se o logaritmo a ambos os membros da Expressão 3, obtêm-se a Expressão 8:

$$\log \left(\frac{\Delta R_{n,B}}{\Delta R_{n,A}} \right) = \log(1 + E_X)^{(n_B - n_A)} \text{ Exp. 8}$$

Utilizando a propriedade operatória do logaritmo de uma razão, pode-se reescrever o primeiro membro da Expressão 8, conforme demonstrado na Expressão 9:

$$\log \left(\frac{\Delta R_{n,B}}{\Delta R_{n,A}} \right) = \log(\Delta R_{n,B}) - \log(\Delta R_{n,A}) \text{ Exp. 9}$$

Por sua vez, utilizando a propriedade operatória do logaritmo de uma potência, pode-se reescrever o segundo membro da Expressão 8, conforme demonstrado na Expressão 10:

$$\log(1 + E_X)^{(n_B - n_A)} = (n_B - n_A) \log(1 + E_X) \text{ Exp. 10}$$

Assim, substituindo as Expressões obtidas em 9 e 10 na Expressão 8, obtêm-se como resultado a Expressão 11:

$$\log(\Delta R_{n,B}) - \log(\Delta R_{n,A}) = (n_B - n_A) \log(1 + E_X) \text{ Exp. 11}$$

Isolando o termo $\log(1 + E_X)$ no segundo membro da Expressão 11, obtêm-se a Expressão 12:

$$\frac{\log(\Delta R_{n,B}) - \log(\Delta R_{n,A})}{(n_B - n_A)} = \log(1 + E_X) \quad \text{Exp. 12}$$

Porém, conforme demonstrado na Expressão 13, o primeiro membro da Expressão 12 consiste justamente na definição de coeficiente angular (slope) da reta decorrente do processo de linearização na Figura 45:

$$\frac{\log(\Delta R_{n,B}) - \log(\Delta R_{n,A})}{(n_B - n_A)} = \frac{\Delta y}{\Delta x} = m \quad \text{Exp. 13}$$

Desta forma, pode-se reescrever a Expressão 12 conforme demonstrado na Expressão 14:

$$\log(1 + E_X) = m \quad \text{Exp. 14}$$

Utilizando a definição de logaritmo, podemos reescrever a Expressão 14 conforme a Expressão 15:

$$10^m = 1 + E_X \quad \text{Exp. 15}$$

Por fim, isolando-se a eficiência de amplificação no primeiro membro, obtêm-se a Expressão 16, que consiste na expressão correta para determinação da eficiência de amplificação a partir do logaritmo da fluorescência reportada na reação de PCR, confirmando portanto, a hipótese aventada por GENTLE et al. (2001):

$$E_X = 10^m - 1 \quad \text{Exp. 16}$$

onde, para o cálculo de m:

n_A e $\log(\Delta R_{n,A})$ são as coordenadas do ponto A' no gráfico linearizado da Figura 45;

n_B e $\log(\Delta R_{n,B})$ são as coordenadas do ponto B' no gráfico linearizado da Figura 45;

Oportuno ressaltar, que possivelmente este seja o primeiro estudo a apresentar a dedução completa das Expressões 6, 7 e 16, uma vez que até a data de início da redação deste trabalho, não havia sido localizado na literatura técnico-científica demonstração destas deduções, nem mesmo qualquer menção à utilização da Expressão 7. Com os objetivos de validar estas expressões, assim como demonstrar que as expressões apresentadas nos trabalhos de GENTLE et al. (2001), LIU & SAINT (2002) e PEIRSON et al. (2003) possuem erros incorporados e também avaliar o erro associado à utilização de cada uma delas, no presente estudo, foi realizado um experimento secundário *in silico*, no qual foram definidas 11 eficiências de amplificação compreendidas entre 0,60 e 1,10 variando 0,05 entre si. Arbitrando-se um valor de ciclo qualquer (n-1) e uma intensidade de fluorescência correspondente para este ciclo (ΔR_{n-1}), a intensidade de fluorescência correspondente ao ciclo imediatamente subsequente (ΔR_n) foi determinada para cada valor de eficiência simulada, através da Expressão 1, construindo assim trechos de curvas de fluorescência reportada simuladas, para diversos valores de eficiência de amplificação. Por fim, utilizando-se as intensidades de fluorescência ΔR_{n-1} e ΔR_n as eficiências de amplificação foram calculadas, devendo-se obviamente ser encontrados os mesmos valores inicialmente definidos, para a validação das expressões.

Dentre as expressões que obtiverem êxito em sua validação, será utilizada no presente estudo para determinação das eficiências de amplificação a partir dos valores de ΔR_n da própria reação, aquela que apresentar maior simplicidade de cálculo.

Por fim, LIU & SAINT (2002a), demonstram em seu trabalho que calculando-se a eficiência de amplificação associada a cada ciclo e plotando-se em função do ciclo, é esperada uma queda no valor da mesma a partir do início da saturação (Figura 46). De maneira complementar, PEIRSON et al. (2003) ressaltam que na prática, o cálculo das eficiências de amplificação anteriores à

fase log-linear são afetados pelo ruído do sinal de fluorescência, resultando em curvas de amplificação com o aspecto apresentado na Figura 46. Desta forma, o valor da eficiência de amplificação que caracteriza a reação de qPCR fica definido através do pequeno platô situado imediatamente a montante do início da saturação.

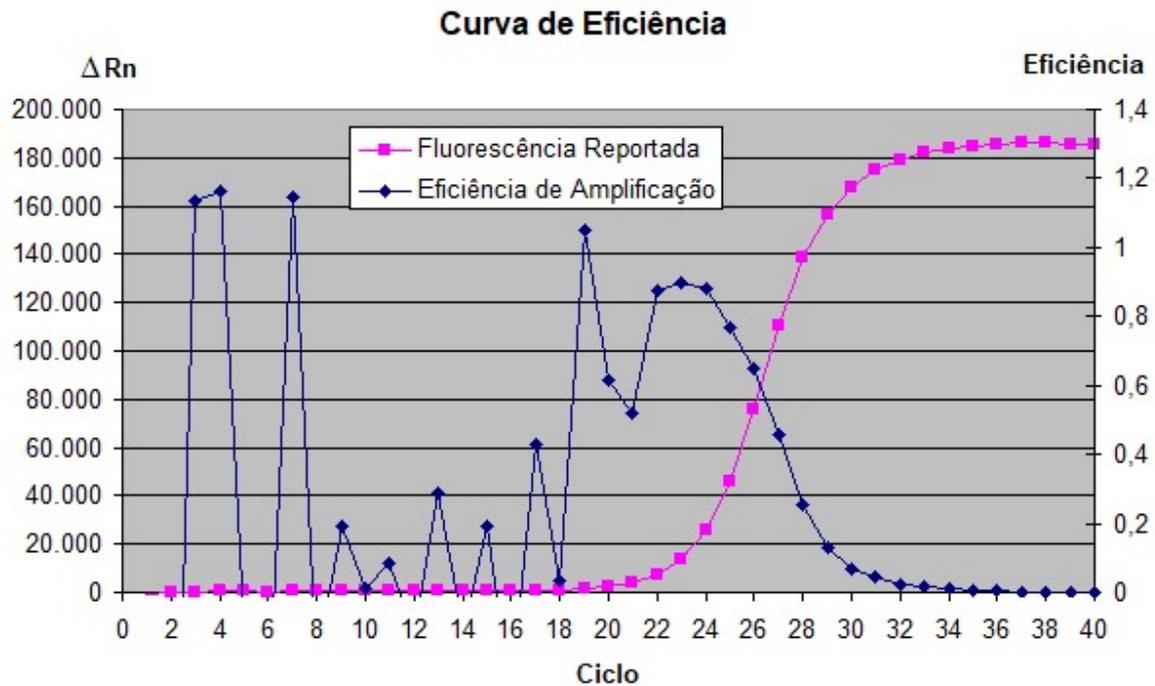


Figura 46 – Comportamento da eficiência de amplificação em decorrência da saturação e ruído de fundo da técnica. Fonte: O autor

3.8.7 Metodologia de cálculo para quantificação relativa e a redução dos erros associados

Com base no trabalho de LIVAK & SCHMITTGEN (2001), pode-se afirmar que numa reação de PCR, o número de amplicons relativos a um gene de interesse x , após n ciclos de amplificação, pode ser calculado através da Expressão 17:

$$X_n = X_0(1 + E_x)^n \text{ Exp. 17}$$

onde:

X_0 é a quantidade inicial de DNA/cDNA do gene de interesse x na amostra;

E_x é a eficiência de amplificação do gene de interesse x.

Assim, no valor de *threshold*, obtêm-se a Expressão 18:

$$X_T = X_0(1 + E_x)^{C_{T,x}} \text{ Exp. 18}$$

onde:

X_T é a quantidade de amplicons correspondente ao nível de fluorescência de *threshold*, para o gene de interesse x;

$C_{T,x}$ é o número de ciclos de *threshold*, para o gene de interesse x.

O ponto chave para a compreensão da quantificação relativa por qPCR, consiste em perceber que o objetivo final da técnica é determinar a proporção entre os níveis de expressão gênica, nas condições iniciais das amostras, ou seja, antes de qualquer amplificação. Porém, não é possível realizar a leitura direta dos valores iniciais, uma vez que os mesmos possuem intensidade inferior a do ruído de fundo da técnica. Assim só é possível realizar as leituras correspondentes aos valores de *threshold* estabelecidos, necessitando portanto, de uma expressão que permita calcular as condições iniciais das amostras a partir das leituras de *threshold* realizadas. Desta forma, isolando-se na Expressão 18, a quantidade inicial de DNA/cDNA do gene de interesse, obtêm-se a Expressão 19:

$$X_0 = X_T(1 + E_x)^{-C_{T,x}} \text{ Exp. 19}$$

Realizando raciocínio análogo para um gene de referência R, obtêm-se a Expressão 20:

$$R_0 = R_T(1 + E_R)^{-C_{T,R}} \text{ Exp. 20}$$

A operação de normalização do gene de interesse com o gene de referência, como já comentado no cap. 3.8.5, de fundamental importância para eliminar a influência de fatores como eventuais diferenças de input gênico nas

amostras (já que elas são dosadas em volume e com concentração estabelecida a partir de RNA total), resulta na Expressão 21:

$$\frac{X_0}{R_0} = \frac{X_T (1 + E_X)^{-C_{T,X}}}{R_T (1 + E_R)^{-C_{T,R}}} \text{ Exp. 21}$$

Para maior simplicidade, pode-se denotar $\frac{X_0}{R_0}$ simplesmente por X_{0N} ,

conforme Expressão 22:

$$X_{0N} = \frac{X_T (1 + E_X)^{-C_{T,X}}}{R_T (1 + E_R)^{-C_{T,R}}} \text{ Exp. 22}$$

onde:

X_{0N} é a quantidade inicial normalizada de DNA/cDNA do gene de interesse x na amostra;

Dividindo-se a Expressão 22 relativa à situação questionada, pela Expressão 22 relativa à situação calibradora, obtêm-se a Expressão 23, a qual constitui o objetivo final da análise de quantificação relativa por qPCR.

$$\frac{X_{0N,Q}}{X_{0N,C}} = \frac{\frac{X_{T,Q} (1 + E_{X,Q})^{-C_{T,X,Q}}}{R_{T,Q} (1 + E_{R,Q})^{-C_{T,R,Q}}}}{\frac{X_{T,C} (1 + E_{X,C})^{-C_{T,X,C}}}{R_{T,C} (1 + E_{R,C})^{-C_{T,R,C}}}} \text{ Exp. 23}$$

A qual pode-se reorganizar para melhor visualização no formato da Expressão 24:

$$\frac{X_{0N,Q}}{X_{0N,C}} = \frac{\frac{X_{T,Q} (1 + E_{X,Q})^{-C_{T,X,Q}}}{R_{T,Q} (1 + E_{R,Q})^{-C_{T,R,Q}}}}{\frac{X_{T,C} (1 + E_{X,C})^{-C_{T,X,C}}}{R_{T,C} (1 + E_{R,C})^{-C_{T,R,C}}}} = \frac{X_{T,Q} (1 + E_{X,Q})^{-C_{T,X,Q}}}{R_{T,Q} (1 + E_{R,Q})^{-C_{T,R,Q}}} \cdot \frac{R_{T,C} (1 + E_{R,C})^{-C_{T,R,C}}}{X_{T,C} (1 + E_{X,C})^{-C_{T,X,C}}} \text{ Exp. 24}$$

Onde cada um dos quatro fatores pode ser calculado individualmente através da expressão $X_T(1 + E_X)^{-C_{T,x}}$ e subsequentemente realizadas as operações de normalização, cálculo da média entre replicatas biológicas e determinação do nível de expressão gênica.

Oportuno ressaltar, que possivelmente este seja o primeiro estudo a apresentar a Expressão 24, uma vez que até a data de início da redação deste trabalho, não havia sido localizado na literatura técnico-científica qualquer descrição ou dedução de expressão idêntica ou semelhante a esta. Também vale ressaltar que escrita na forma da Expressão 23, configura a Expressão Geral para Determinação do Nível de Expressão Gênica Relativa, sendo possível a partir dela, a dedução de todas as demais expressões disponíveis na literatura científica, conforme demonstrado no Apêndice V do presente trabalho, juntamente com a indicação da limitação de uso de cada uma das expressões.

A partir da leitura do Apêndice V, compreende-se que as expressões apresentadas no mesmo, as quais para maior comodidade são reapresentadas na Tabela 16 a seguir, não constituem metodologias distintas para realização da quantificação relativa através do qPCR, mas sim diferentes expressões de uma mesma metodologia, adaptadas a situações particulares. Não há portanto, dentre as expressões apresentadas, que se falar em determinada expressão ser melhor que outra. Há em determinados casos, expressões cujo uso se torna proibitivo, sob pena de resultarem valores incorretos, devendo porém, todas as expressões cujo uso for adequado, fornecer os mesmos resultados. A Tabela 16 também configura uma contribuição do presente trabalho à prática do qPCR, uma vez que compila todas as expressões encontradas na literatura científica numa única planilha, juntamente com a definição de critérios objetivos, para uma rápida seleção da expressão adequada a ser utilizada em cada experimento.

Importante salientar, que existem outras metodologias para determinação da quantificação relativa por qPCR além da apresentada, como a título de exemplo o trabalho de LIU & SAINT (2002a), o qual realiza a modelagem da curva de amplificação através de uma função sigmoidal, em substituição à função exponencial. Evidentemente, no caso de modelagens matemáticas distintas,

muito provavelmente os resultados também serão distintos. O presente trabalho se restringe apenas ao estudo de modelos exponenciais.

Tabela 16 – Quadro resumo das expressões disponíveis para determinação da expressão gênica relativa através do qPCR. Fonte: O autor

Referência	Expressão	Eficiências de Amplificação envolvidas	Threshold
LIVAK & SCHMITTGEN (2001)	$2^{-\Delta\Delta Ct}$	Todas são iguais à 100%.	Valores da situação questionada e situação calibradora são idênticos para um mesmo gene.
LIU & SAINT (2002)	$(1 + E)^{-\Delta\Delta Ct}$	Todas são diferentes de 100%, porém idênticas entre si.	Valores da situação questionada e situação calibradora são idênticos para um mesmo gene.
Roche Applied Science	$(1 + E_X)^{(C_{T,X,C} - C_{T,X,Q})} \cdot (1 + E_R)^{(C_{T,R,Q} - C_{T,R,C})}$	Valores da situação questionada e situação calibradora são idênticos para um mesmo gene.	Valores da situação questionada e situação calibradora são idênticos para um mesmo gene.
PFAFFL (2001)	$\frac{(1 + E_{X,C})^{C_{T,X,C}} (1 + E_{R,Q})^{C_{T,R,Q}}}{(1 + E_{X,Q})^{C_{T,X,Q}} (1 + E_{R,C})^{C_{T,R,C}}}$	Todas são diferentes entre si.	Valores da situação questionada e situação calibradora são idênticos para um mesmo gene.
Expressão Geral deduzida no presente trabalho	$\frac{X_{T,Q} (1 + E_{X,Q})^{-C_{T,X,Q}} R_{T,C} (1 + E_{R,C})^{-C_{T,R,C}}}{R_{T,Q} (1 + E_{R,Q})^{-C_{T,R,Q}} X_{T,C} (1 + E_{X,C})^{-C_{T,X,C}}}$	Todas são diferentes entre si.	Todos são diferentes entre si.

3.8.8 Número de replicatas biológicas e a melhora da relevância estatística

Intuitivamente, aumentando-se o número de replicatas biológicas, espera-se uma melhora na qualidade das médias obtidas (mais próximas do valor verdadeiro da grandeza), resultando assim num aumento da facilidade para demonstrar a relevância estatística dos resultados, assim como também espera-se uma redução dos erros amostral e populacional. No presente trabalho foi previamente estipulada para cada condição experimental, a utilização de três replicatas biológicas distintas e para cada amostra submetida ao qPCR, 3 a 4 replicatas técnicas, variando conforme a disponibilidade de acomodação das amostras nas placas de PCR, totalizando assim um N igual a 9 para as condições experimentais com nisina livre e um N igual a 12 para as condições experimentais com lipossomo branco e de nisina.

A fim de extrapolar as médias amostrais obtidas para valores populacionais com uma confiabilidade de 95%, foram utilizados testes t-student bicaudais, para comparação entre as médias de dois conjuntos de amostras, relativos à um mesmo gene e *time-point*, porém, condições experimentais distintas, considerando-se como hipótese que as variâncias populacionais de cada conjunto sejam desconhecidas e distintas. Para tal, foram utilizadas as Expressões 25 e 26, contabilizando para cada conjunto de amostras somente a quantidade de replicatas que efetivamente permaneceram no estudo e adotando-se nível de significância de 5% ($p < 0,05$). Resultados que eventualmente não tenham demonstrado relevância estatística foram omitidos.

$$t = \frac{(\bar{x}_1 - \bar{x}_2) - \mu}{s} = \frac{(\bar{x}_1 - \bar{x}_2)}{\sqrt{\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}}} \quad \text{Exp. 25}$$

$$GL = n_1 + n_2 - 2 \quad \text{Exp. 26}$$

3.8.9 Teoria de propagação de erros e a determinação correta do erro experimental

Por fim, o último aspecto relevante a ser destacado no presente trabalho necessário à obtenção de resultados consistentes no PCR quantitativo, consiste na correta determinação do valor do erro experimental. É de fundamental importância ressaltar, que mesmo após os resultados já terem demonstrado significância estatística, a amplitude do erro experimental pode ser suficiente para tornar ou não um resultado inconclusivo. Assim sua correta determinação é necessária tanto para se evitar a divulgação de resultados que na verdade sejam inconclusivos, como para se evitar a não divulgação de resultados que na verdade sejam conclusivos.

Nas situações em que por exemplo, estão sendo comparados dados de *time-points* distintos, porém, extraídos da mesma replicata biológica, obtêm-se maior exatidão dos resultados, prosseguindo-se individualmente com o cálculo do nível de expressão gênica de cada replicata biológica e consolidando o valor das

diferentes replicatas ao final. Assim, a última manipulação matemática realizada sobre os dados será calcular a média aritmética amostral entre os níveis de expressão gênica das diferentes replicatas biológicas e realizar sua extrapolação para a média populacional. Nesta situação, o erro associado à média populacional, pode ser determinado a partir do desvio padrão amostral através da Expressão 27.

$$\sigma_p = \frac{\sigma_a}{\sqrt{N}} \text{ Exp. 27}$$

Já nas situações em que estão sendo comparados dados de replicatas biológicas distintas (maioria das situações), uma vez que não há correspondência entre nenhuma replicata biológica da situação questionada e nenhuma replicata biológica da situação calibradora, não há qualquer critério justificável para comparação destes valores diretamente entre si. Assim, imediatamente após realizada a normalização dos dados, deve-se consolidar os valores relativos a uma mesma condição experimental num único valor, para então prosseguir com a determinação do nível de expressão gênica relativa. Porém, ao realizarmos quaisquer outras manipulações matemáticas sobre os dados após o cálculo da média, faz-se necessário realizar a propagação do erro experimental.

Conforme VUOLO (1996), dada uma grandeza cujo valor é determinado através de n variáveis, conforme Expressão 28:

$$y = f(x_1, x_2, x_3, \dots, x_n) \text{ Exp. 28}$$

O erro associado a esta grandeza pode ser calculado através da Expressão Geral da Propagação de Erros, representada pela Expressão 29:

$$\sigma_y^2 = \left(\frac{\partial y}{\partial x_1}\right)^2 \sigma_{x_1}^2 + \left(\frac{\partial y}{\partial x_2}\right)^2 \sigma_{x_2}^2 + \left(\frac{\partial y}{\partial x_3}\right)^2 \sigma_{x_3}^2 + \dots + \left(\frac{\partial y}{\partial x_n}\right)^2 \sigma_{x_n}^2 \text{ Exp. 29}$$

Onde $\frac{\partial y}{\partial x_i}$ denota a derivada parcial de y em relação à variável x_i e σ_{x_i} o erro

experimental associado à variável x_i .

Baseando-se nisso, foram deduzidas a seguir algumas expressões para propagação de erro em situações bastante frequentes na determinação do nível de expressão gênica relativa:

$$A) \Delta\Delta C_t = \Delta C_{t, \text{condição teste}} - \Delta C_{t, \text{condição calibradora}}$$

$$\sigma_{\Delta\Delta C_t}^2 = \left(\frac{\partial \Delta\Delta C_t}{\partial \Delta C_{t, \text{condição teste}}} \right)^2 \sigma_{\Delta C_{t, \text{condição teste}}}^2 + \left(\frac{\partial \Delta\Delta C_t}{\partial \Delta C_{t, \text{condição calibradora}}} \right)^2 \sigma_{\Delta C_{t, \text{condição calibradora}}}^2 = 1^2 \sigma_{\Delta C_{t, \text{condição teste}}}^2 + 1^2 \sigma_{\Delta C_{t, \text{condição calibradora}}}^2 = \sigma_{\Delta C_{t, \text{condição teste}}}^2 + \sigma_{\Delta C_{t, \text{condição calibradora}}}^2 \Rightarrow$$

$$\Rightarrow \sigma_{\Delta\Delta C_t} = \sqrt{\sigma_{\Delta C_{t, \text{condição teste}}}^2 + \sigma_{\Delta C_{t, \text{condição calibradora}}}^2} \quad \text{Exp. 30}$$

$$B) (1+E)^{-\Delta\Delta C_t}$$

$$\sigma_{(1+E)^{-\Delta\Delta C_t}}^2 = \left(\frac{\partial (1+E)^{-\Delta\Delta C_t}}{\partial \Delta\Delta C_t} \right)^2 \sigma_{\Delta\Delta C_t}^2 = ((-1) \cdot (1+E)^{-\Delta\Delta C_t} \cdot \ln(1+E))^2 \sigma_{\Delta\Delta C_t}^2 = ((1+E)^{-\Delta\Delta C_t})^2 \cdot (\ln(1+E))^2 \cdot \sigma_{\Delta\Delta C_t}^2 \Rightarrow$$

$$\Rightarrow \sigma_{(1+E)^{-\Delta\Delta C_t}} = \sqrt{((1+E)^{-\Delta\Delta C_t})^2 \cdot (\ln(1+E))^2 \cdot \sigma_{\Delta\Delta C_t}^2} \Rightarrow \ln(1+E) \cdot (1+E)^{-\Delta\Delta C_t} \cdot \sigma_{\Delta\Delta C_t} \quad \text{Exp. 31}$$

$$C) \frac{a}{b}, \text{ onde } a = \frac{X_{T,Q}(1+E_{X,Q})^{-C_{T,X,Q}}}{R_{T,Q}(1+E_{R,Q})^{-C_{T,R,Q}}} \text{ e } b = \frac{X_{T,C}(1+E_{X,C})^{-C_{T,X,C}}}{R_{T,C}(1+E_{R,C})^{-C_{T,R,C}}}$$

$$\sigma_{\frac{a}{b}}^2 = \left(\frac{\partial \frac{a}{b}}{\partial a} \right)^2 \sigma_a^2 + \left(\frac{\partial \frac{a}{b}}{\partial b} \right)^2 \sigma_b^2 = \left(\frac{1}{b} \right)^2 \sigma_a^2 + \left(\frac{-a}{b^2} \right)^2 \sigma_b^2 = \frac{1}{b^2} \cdot \sigma_a^2 + \frac{a^2}{b^4} \cdot \sigma_b^2 \quad \text{Exp. 32}$$

multiplicando-se ambos os termos por $\frac{b^2}{a^2}$, obtêm-se:

$$\frac{b^2}{a^2} \cdot \sigma_{\frac{a}{b}}^2 = \frac{b^2}{a^2} \frac{1}{b^2} \cdot \sigma_a^2 + \frac{b^2}{a^2} \frac{a^2}{b^4} \cdot \sigma_b^2 \Rightarrow \left(\frac{b}{a} \right)^2 \cdot \sigma_{\frac{a}{b}}^2 = \frac{1}{a^2} \cdot \sigma_a^2 + \frac{1}{b^2} \cdot \sigma_b^2 \Rightarrow \left(\frac{\sigma_{\frac{a}{b}}}{\frac{a}{b}} \right)^2 = \left(\frac{\sigma_a}{a} \right)^2 + \left(\frac{\sigma_b}{b} \right)^2 \Rightarrow$$

$$\Rightarrow \frac{\sigma_{a/b}}{a/b} = \sqrt{\left(\frac{\sigma_a}{a}\right)^2 + \left(\frac{\sigma_b}{b}\right)^2} \Rightarrow \sigma_{a/b} = \frac{a}{b} \cdot \sqrt{\left(\frac{\sigma_a}{a}\right)^2 + \left(\frac{\sigma_b}{b}\right)^2} \quad \text{Exp. 33}$$

Objetivando corroborar com a divulgação da importância da correta determinação do erro experimental, assim como compreender o quanto tal fator possa tornar conclusivo/inconclusivo os resultados do qPCR, no presente estudo foram comparados os erros obtidos para o nível de expressão gênica relativa, entre as condições experimentais nisina livre na concentração de 100 mg/L e nisina livre na concentração de 1 mg/L, com ambas amostras extraídas 60 min após as respectivas adições.

Os erros foram calculados de 4 diferentes maneiras, denominadas como erro amostral não propagado, erro amostral propagado, erro populacional não propagado e erro populacional propagado, das quais somente a última constitui o valor correto, uma vez que considera tanto a extrapolação do erro amostral para a população, como a propagação deste através das manipulações matemáticas realizadas subsequentemente.

Por fim, todos os erros obtidos foram divididos pelos valores de suas respectivas médias populacionais, a fim de que as magnitudes pudessem ser expressas em termos destas.

4. Resultados

4.1 Preparo dos lipossomos

O aspecto do filme lipídico fino decorrente da metodologia e parâmetros descritos no item 3.2 do presente trabalho, pode ser visualizado no Apêndice VI, onde percebe-se a obtenção de um filme bastante homogêneo recobrendo toda a superfície inferior do balão de vidro.

Já o aspecto dos lipossomos ao longo da preparação pode ser exemplificado através das imagens da Figura 47, onde primeiramente à esquerda tem-se o tampão fosfato a ser utilizado para hidratação do filme lipídico. Já na imagem do centro tem-se o aspecto dos lipossomos brancos imediatamente após os ciclos homogeneizadores, onde se destaca a elevada turbidez da suspensão. Por fim, na imagem da direita tem-se o aspecto dos lipossomos brancos imediatamente após os ciclos de redução de tamanho. Nota-se sensível redução da turbidez da suspensão, fato que é coerente com a redução do tamanho das partículas. Porém, faz-se oportuno salientar a permanência de uma turbidez residual, fato este que impedirá posteriormente o monitoramento da multiplicação bacteriana através da densidade óptica com uso do espectrofotômetro, demandando assim para ambos tipos de lipossomos, a realização de plaqueamento e contagem de UFC para esta finalidade, como já anteriormente mencionado no cap. 3.4.

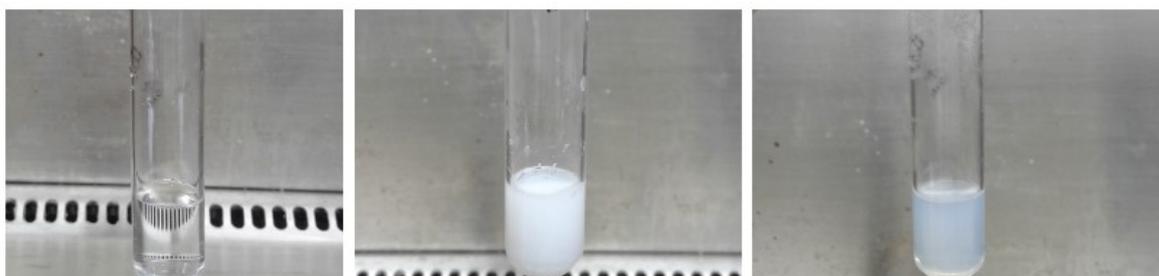


Figura 47 – Tubos Duran com tampão fosfato (esquerda), lipossomos brancos imediatamente após o ciclo homogeneizador (centro) e imediatamente após o ciclo de redução de tamanho (direita). Fonte: O autor

Os oito lotes de lipossomos produzidos foram identificados como BP_01, 02, 03 e 04, no caso dos lipossomos brancos e NI_01, 02, 03 e 04, no caso dos lipossomos de nisina.

4.2 Caracterização dos lipossomos

A) Diâmetro e índice de polidispersão:

Tabela 17 – Resultados obtidos através do equipamento Zetasizer nano S90. Da esquerda para a direita são apresentados o diâmetro médio e respectivo índice de polidispersão, os três diâmetros mais frequentes na solução, em ordem decrescente e as respectivas frequências associadas a cada diâmetro. Fonte: O autor

Sample Name	Z-Ave d.nm	PdI	Pk 1 Mean Int d.nm	Pk 2 Mean Int d.nm	Pk 3 Mean Int d.nm	Pk 1 Area Int Percent	Pk 2 Area Int Percent	Pk 3 Area Int Percent
BP_01_20dez	99,26	0,841	292,9	48,70	0,8332	61,9	26,0	12,1
BP_02_20dez	130,5	0,400	118,6	363,6	5,594	73,3	19,7	6,9
BP_03_20dez	84,79	0,593	115,3	2,328	4903	78,1	12,9	9,0
BP_04_20dez	692,9	0,315	713,7	3741	0,000	81,6	18,4	0,0
NI_01_20dez	53,02	0,937	73,17	643,9	1,034	61,8	21,8	16,4
NI_02_20dez	141,7	0,365	119,5	408,2	12,38	72,0	13,4	7,8
NI_03_20dez	92,01	0,705	231,1	71,62	2,900	51,0	43,4	5,6
NI_04_20dez	91,17	0,979	103,4	538,1	2,328	57,0	36,4	6,5

Na Tabela 17 são apresentados os diâmetros médios e IPDs dos lotes de lipossomos produzidos no presente trabalho. Os lotes com diâmetros predominantes mais divergentes (BP_04 com 713,7 nm e NI_01 com 73,17 nm), foram destinados ao levantamento das curvas de crescimento (seja por espectrofotometria ou plaqueamento e contagem de UFC), enquanto os demais lotes, mais próximos do diâmetro definido no cap. 3.3 e também resultando em melhor pareamento entre as diferentes condições experimentais, foram utilizados como replicatas biológicas para extração de RNA, conforme indicado na Tabela 18.

Tabela 18 – Distribuição dos lotes de lipossomos entre as aplicações e replicatas biológicas. Fonte: O autor

Lote	Aplicação	Replicata Biológica Nº
NI-01	Curva de crescimento	-
NI-02	Extração de RNA	1
NI-03	Extração de RNA	2
NI-04	Extração de RNA	3
BP-01	Extração de RNA	1
BP-02	Extração de RNA	2
BP-03	Extração de RNA	3
BP-04	Curva de crescimento	-

B) Potencial zeta:

Na Tabela 19 são apresentados os potenciais Zeta dos lotes de lipossomos produzidos no presente trabalho.

Tabela 19 – Potenciais Zeta obtidos através do equipamento Zetasizer nano Z, para os lotes de lipossomos branco (esquerda) e de nisina (direita).

Fonte: O autor

Sample Name	ZP mV	Sample Name	ZP mV
BP_01 20dez 1	-8.81	NI_01 20dez 1	19,7
BP_01 20dez 2	-9.92	NI_01 20dez 2	18,0
BP_01 20dez 3	-10,7	NI_01 20dez 3	19,2
BP_02 20dez 1	-20,4	NI_02 20dez 1	14,4
BP_02 20dez 2	-17,5	NI_02 20dez 2	13,9
BP_02 20dez 3	-16,3	NI_02 20dez 3	14,1
BP_03 20dez 1	-24,8	NI_03 20dez 1	1,73
BP_03 20dez 2	-24,4	NI_03 20dez 2	2,69
BP_03 20dez 3	-27,4	NI_03 20dez 3	3,24
BP_04 20dez 1	-3,04	NI_04 20dez 1	5,08
BP_04 20dez 2	-2,37	NI_04 20dez 2	5,62
BP_04 20dez 3	-2,16	NI_04 20dez 3	5,46

C) Eficiência de encapsulação:

As placas relativas a cada um dos lotes de lipossomos de nisina, foram observadas 24, 48 e 72 h após a adição das alíquotas de 10 µL dos filtrados, não tendo sido encontrado qualquer indício de efeito inibitório sobre o desenvolvimento das cepas indicadoras, mesmo considerando-se o filtrado sem

qualquer diluição, demonstrando assim que 100% da nisina livre foi incorporada na preparação dos lipossomos. A título de exemplo, é apresentado no Apêndice VI do presente trabalho, o aspecto das placas relativas ao lote NI-03.

4.3 Curvas de crescimento

Plotando-se as leituras obtidas por espectrofotometria 600 nm, para o cultivo de *L. monocytogenes* sem a adição de nisina, foi obtida a curva de crescimento apresentada na Figura 48.

Observando-se o gráfico, é possível identificar claramente um comportamento exponencial, o que caracteriza a fase log da curva de crescimento, até por volta de OD=0,600 (ponto de inflexão da curva). Uma vez que na fase log os microrganismos se encontram realizando seu metabolismo de forma plena, configurando assim sua expressão gênica mais representativa, para as demais condições experimentais do presente trabalho, todas as adições foram realizadas em OD=0,300 (aproximadamente o centro da fase log).

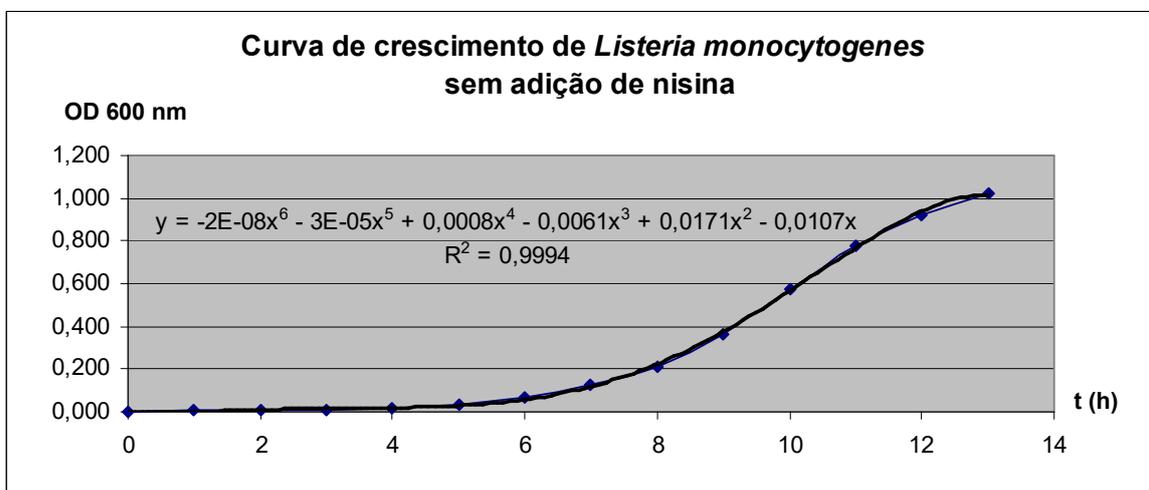


Figura 48 – Curva de crescimento de *Listeria monocytogenes* sem adição de nisina. Fonte: O autor

Ainda, realizando uma regressão polinomial a partir da curva de crescimento obtida, foi ajustado um polinômio de grau 6, com coeficiente de determinação $R^2=0,9994$, função esta que será útil para construção de outros

gráficos. A partir da função obtida, considerando-se como valor de $y=0.300$, foi obtido numericamente pelo método da bissecção o valor de $x=8,95$ h.

Como descrito no cap. 3.4 do presente trabalho, em cada *time-point* do cultivo sem adição de nisina, também foi realizado o plaqueamento e contagem de UFC, a fim de se estabelecer uma correlação entre as leituras desta metodologia e da espectrofotometria. Assim, plotando-se os valores obtidos através da espectrofotometria contra os valores obtidos através da contagem de UFC e ajustando-se uma reta pelo método dos mínimos quadrados, foi obtido o gráfico apresentado na Figura 49, sobre o qual realizando-se uma regressão linear resultou na função $y = 7,1329269839 \times 10^8 x$, com coeficiente de determinação $R^2 = 0,96$, cujo coeficiente angular constitui o fator de conversão entre as leituras das duas metodologias.

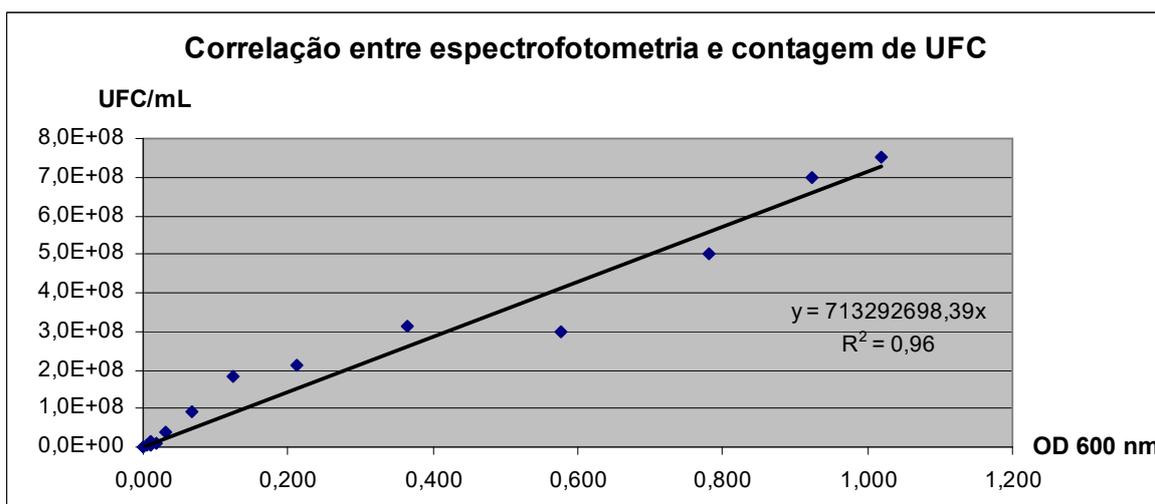


Figura 49 – Correlação entre as leituras obtidas por espectrofotometria e por contagem de UFC para o cultivo de *Listeria monocytogenes* sem adição de nisina. Fonte: O autor

Por sua vez, plotando-se as leituras obtidas por espectrofotometria, para adições de nisina livre realizadas em $OD=0.300$, com concentrações variando de 0,1 mg/L até 100 mg/L, foram obtidas as curvas de crescimento apresentadas na Figura 50. Tais curvas demonstram a ocorrência de um efeito bactericida para a concentração de 100 mg/L (evidenciado pela redução da densidade óptica ao valor do meio de cultivo previamente à inoculação do microrganismo e mantendo-se assim posteriormente) e um efeito de redução do crescimento para a

concentração de 10 mg/L. Possivelmente um efeito bacteriostático (que seria evidenciado pela manutenção da densidade óptica em um valor constante ao longo do tempo) seria obtido através de uma concentração intermediária, pois para concentrações menores, tais como 1 mg/L e 0,1 mg/L observa-se uma tendência de sobreposição das curvas de crescimento, sugerindo que estas concentrações já não exerçam influência significativa sobre a curva de crescimento de *L. monocytogenes*.

Prevendo que a nisina nanoencapsulada apresente uma liberação controlada e conseqüentemente ação mais lenta que a nisina livre, para a condição experimental de nisina nanoencapsulada foi empregada uma quantidade de nisina equivalente à concentração de 100 mg/L no meio de cultura (10 mg de nisina). Exclusivamente na condição de nisina livre, além desta concentração, ainda foi realizado o cultivo com uma segunda concentração de 1 mg/L de nisina, a fim de verificar a expressão diferencial dos genes selecionados como conseqüência do efeito dose-dependente.

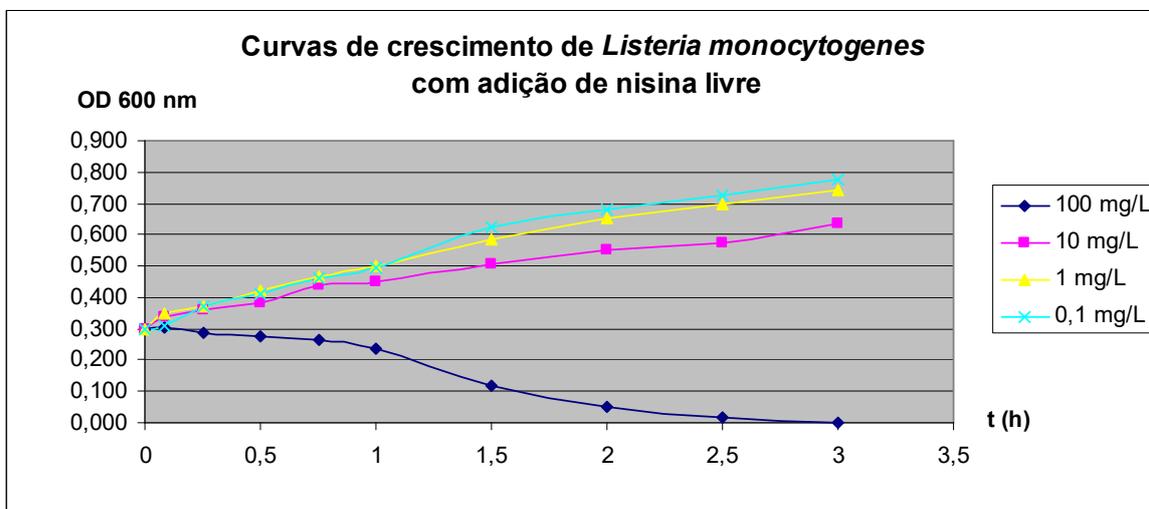


Figura 50 – Curvas de crescimento de *Listeria monocytogenes* com adição de nisina livre.

Fonte: O autor

Realizando regressões polinomiais para as curvas de crescimento obtidas para as concentrações de nisina 100 mg/L, 10 mg/L e 1 mg/L, foram ajustados respectivamente polinômios de grau 3, 2 e 2, com coeficientes de determinação R^2 iguais a 0,9923, 0,9901 e 0,9974, conforme demonstrado na Figura 51.

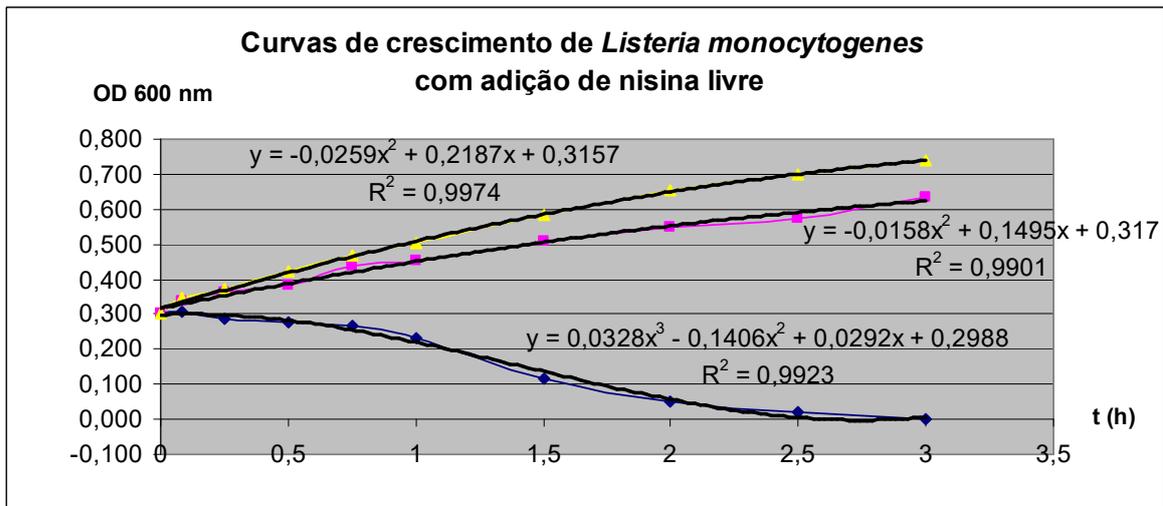


Figura 51 – Funções obtidas por regressão para as curvas de crescimento de *Listeria monocytogenes* com adição de nisina livre. Fonte: O autor

Assim, subtraindo-se o valor de 8,95 h anteriormente determinado, dos valores de x em cada uma das funções indicadas na Figura 51, deslocamos os gráficos das funções para a direita sobre o eixo x, fazendo com que o instante da adição coincida com o ponto de OD=0,300 sobre a curva de crescimento de *L. monocytogenes* sem adição de nisina, conforme demonstrado através da Figura 52.

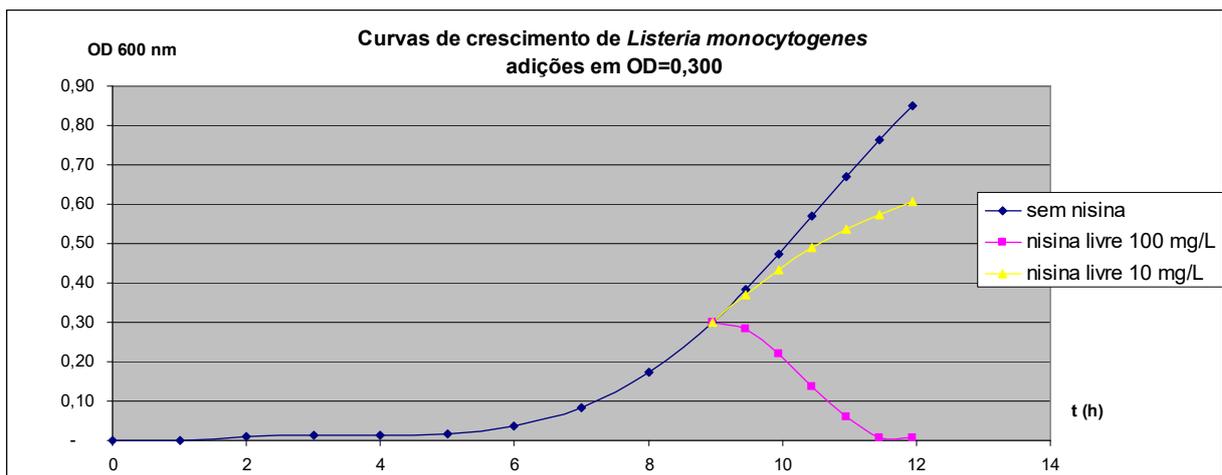


Figura 52 – Sobreposição das curvas de crescimento de *Listeria monocytogenes* sem e com adição de nisina livre, expressas em densidade óptica. Fonte: O autor

Utilizando-se o fator de conversão também anteriormente determinado, pode-se converter o gráfico da Figura 52 de densidade óptica para UFC/mL, conforme demonstrado na Figura 53.

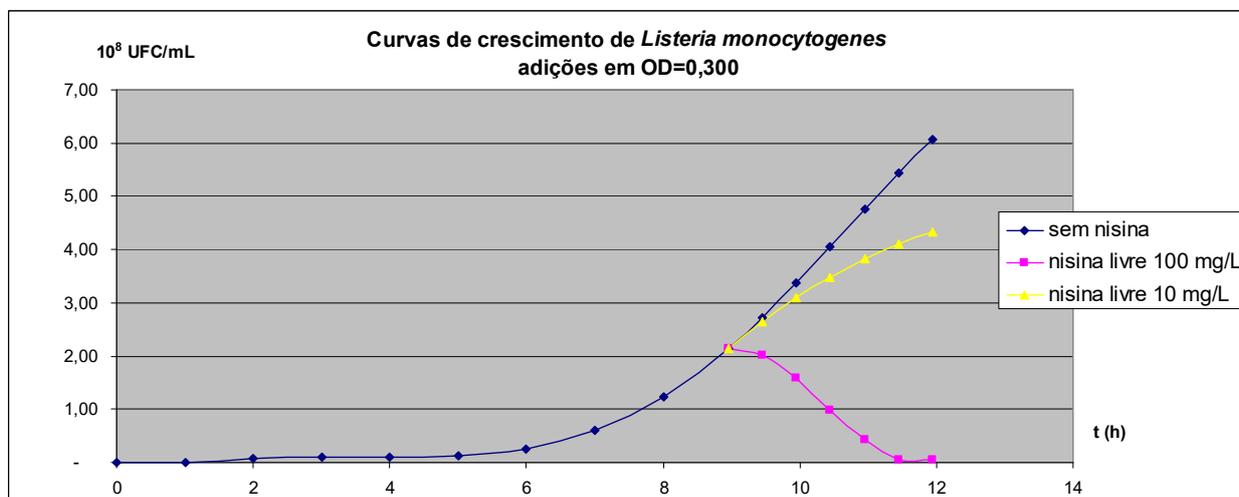


Figura 53 – Sobreposição das curvas de crescimento de *Listeria monocytogenes* sem e com adição de nisina livre, expressas em UFC/mL. Fonte: O autor

Por fim, a partir das contagens de UFC realizadas, foram calculadas as concentrações bacterianas nas amostras dos cultivos com adição de lipossomo de nisina e adição de lipossomo branco, em UFC/mL. Os valores obtidos são apresentados na Tabela 20. De forma semelhante ao anteriormente realizado, plotando-se as curvas de crescimento e deslocando-as sobre o eixo x, para a direita, até que o instante da adição coincida com o ponto de OD=0,300 sobre a curva de crescimento de *L. monocytogenes* sem adição de nisina e sobrepondo os gráficos resultantes à Figura 53, resulta o gráfico apresentado na Figura 54.

Tabela 20 – Concentrações bacterianas nos cultivos de *Listeria monocytogenes* com adição de lipossomo de nisina e adição de lipossomo branco. Fonte: O autor

tempo após adição (h)	concentração na amostra	
	lipossomo nisina (10E+8 UFC/mL)	lipossomo branco (10E+8 UFC/mL)
0	2,15	2,15
1,00	4,17	4,33
2,00	5,17	6,00
3,18	7,67	8,50

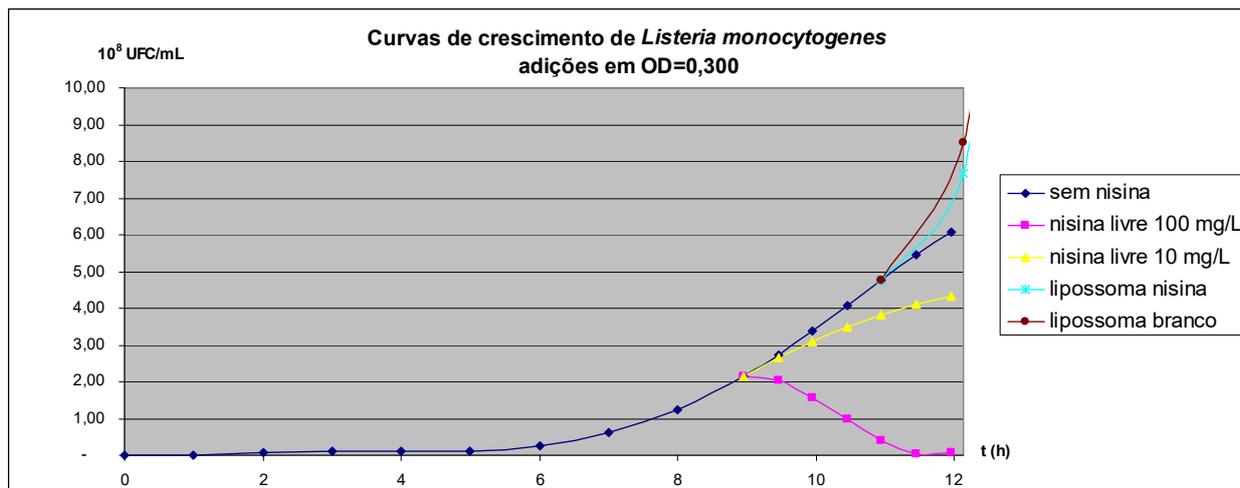


Figura 54 – Sobreposição das curvas de crescimento de *Listeria monocytogenes* para todas as condições experimentais, expressas em UFC/mL. Fonte: O autor

4.4 Seleção dos genes e projeto dos primers

De forma bastante sintética, é apresentada a seguir uma compilação dos genes selecionados para o desenvolvimento do presente trabalho ao longo dos capítulos 1.4 e 3.6, com sua respectiva justificativa de uso, agrupados como critérios de primeira ordem, segunda ordem ou candidatos a gene de referência.

A) Critérios de primeira ordem:

virR - Juntamente com *virS*, constitui um sistema de resposta regulatória bicomponente, responsável por regular a resistência de *L. monocytogenes* aos CAMPs, assim como a capacidade de adesão às células do hospedeiro, através de modificações na membrana celular.

sigB - Responsável por regular a resposta adaptativa de tolerância ao ácido (ATR) de *L. monocytogenes*, produzindo dentre outras alterações, modificações na parede celular, as quais influenciam a resistência de *L. monocytogenes* aos CAMPs.

ctsR – Responsável por inibir a resposta ao choque térmico de *L. monocytogenes*, produzindo dentre outras alterações, modificações no envelope celular, assim como a superexpressão de um gene de resistência aos antimicrobianos que

atuam sobre a parede celular, influenciando a resistência de *L. monocytogenes* aos CAMPs.

lexA – Responsável por inibir a resposta SOS de *L. monocytogenes*, incluindo genes responsáveis pela capacidade de reparo e mutação do DNA, os quais podem influenciar a resistência de *L. monocytogenes* aos CAMPs.

recA - Responsável por ativar a resposta SOS de *L. monocytogenes*, através da degradação de LexA, podendo influenciar a resistência de *L. monocytogenes* aos CAMPs.

B) Critérios de segunda ordem:

prfA - Responsável por regular a virulência de *L. monocytogenes*, sendo possível o aumento do potencial de virulência do microrganismo através do acúmulo de PrfA no citosol.

sod - Responsável pela síntese de superóxido dismutase em *L. monocytogenes*, com regulação positivamente correlacionada ao nível de estresse oxidativo na célula.

kat - Responsável pela síntese de catalase em *L. monocytogenes*, com regulação positivamente correlacionada ao nível de estresse oxidativo na célula.

lmo1433 - Responsável pela síntese de glutathione redutase em *L. monocytogenes*, com regulação positivamente correlacionada ao nível de estresse oxidativo na célula.

dnaA - Responsável pela iniciação da replicação cromossomal em *L. monocytogenes*, com regulação diretamente correlacionada à taxa de divisão celular.

C) Candidatos a gene de referência:

rpoD, *16S rRNA*, *rpsL* e *infA*.

Na Tabela 21 são apresentadas algumas informações adicionais relativas aos genes selecionados, obtidas no Banco de Dados GenBank para o genoma de referência *L. monocytogenes* EGDe, RefSeq NC_003210.1.

Tabela 21 – Informações relativas aos genes selecionados. Fonte: GenBank

	Gene	Id GenBank	Comprimento (pb)
<i>Imo1745</i>	<i>virR</i>	985561	677
<i>Imo0895</i>	<i>sigB</i>	986527	779
<i>Imo0229</i>	<i>ctsR</i>	987186	458
<i>Imo1302</i>	<i>lexA</i>	985139	614
<i>Imo1398</i>	<i>recA</i>	984485	1.046
<i>Imo0200</i>	<i>prfA</i>	987031	713
<i>Imo1439</i>	<i>sod</i>	986791	608
<i>Imo2785</i>	<i>kat</i>	984948	1.466
<i>Imo1433</i>	-	985502	1.340
<i>Imo0001</i>	<i>dnaA</i>	984365	1.355
<i>Imo1454</i>	<i>rpoD</i>	984456	1.124
<i>Imor 04</i>	<i>16S rRNA</i>	987145	1.485
<i>Imo2596</i>	<i>rpsI</i>	987216	392
<i>Imo2610</i>	<i>infA</i>	984951	218

Por fim, a sequência dos primers projetados para cada um dos genes selecionados é apresentada na Tabela 22. Vale ressaltar que para o objetivo geral do trabalho, foram utilizados apenas primers tagueados, alinhados à metodologia RT-qPCR livre de DNase (DNF-RT-qPCR), conforme descrito no capítulo 3.6 do presente trabalho.

Tabela 22 – Relação dos primers projetados e utilizados no presente trabalho. Fonte: O autor

Gene	Primer	Sequência
<i>virR</i>	forward reverseconv reverseRT	ACTTCTCGGATTTGATTACACC GATTTGAGATTGGTGTAGTAGAGG CAGCTTGGTAGAATCGATCAGCTACGATTTGAGATTGGTGTAGTAGAGG
<i>sigB</i>	forward reverseconv reverseRT	GTTACTTGATGTTGTTGGTGG TGATATATCGAGTAGTTCACCC CAGCTTGGTAGAATCGATCAGCTACTGATATATCGAGTAGTTCACCC
<i>ctsR</i>	forward reverseconv reverseRT	CTAGATTTACAATGGAACGAGG TACTTCTTCTTCAAGCAACC CAGCTTGGTAGAATCGATCAGCTACTACTTCTTCTTCAAGCAACC
<i>lexA</i>	forward reverseconv reverseRT	CCTGTCTAACGATTACTTTATCTCC CTTTAGAAGATGAAGCAGAAACTCC CAGCTTGGTAGAATCGATCAGCTACCTTTAGAAGATGAAGCAGAAACTCC
<i>recA</i>	forward reverseconv reverseRT	CGTTAGATATTGCTTTAGGAGTTGG CAATCTCTAAAGCTTGTTCTCC CAGCTTGGTAGAATCGATCAGCTACCAATCTCTAAAGCTTGTTCTCC
<i>prfA</i>	forward reverseconv reverseRT	GGAGTTTCTTTACCATACATAGG TTAGAAGTCATTAGCGAGCAGG CAGCTTGGTAGAATCGATCAGCTACTTAGAAGTCATTAGCGAGCAGG
<i>sod</i>	forward reverseconv reverseRT	GAATCTTGGTTAGCTGTAGAAACG CATTGTTCTGGTCTATTCTTAGCC CAGCTTGGTAGAATCGATCAGCTACCATTGTTCTGGTCTATTCTTAGCC
<i>kat</i>	forward reverseconv reverseRT	GGTTCCGTATCATAACTATTTGGC CGTTTATTCTTACTCAGATACGC CAGCTTGGTAGAATCGATCAGCTACCGTTTATTCTTACTCAGATACGC
1433	forward reverseconv reverseRT	TCAAAGCAGTTAAGTCACTTGC ATCATTGAAGATAGAGAGTCAGGG CAGCTTGGTAGAATCGATCAGCTACATCATTGAAGATAGAGAGTCAGGG
<i>dnaA</i>	forward reverseconv reverseRT	TTATTATTTCCAGTGACCGACC TTGGAATATCTAATCCGTCTGC CAGCTTGGTAGAATCGATCAGCTACTTGAATATCTAATCCGTCTGC
<i>rpoD</i>	forward reverseconv reverseRT	CATCGTCAGAACTTCAATTCC AAAGAAGCCCTGATAGAAGAAGG CAGCTTGGTAGAATCGATCAGCTACAAAGAAGCCCTGATAGAAGAAGG
16S rRNA	forward reverseconv reverseRT	ATTAGCTAGTTGGTAGGGTAATGG CTCTAACAAACAGTACTTTACGATCC CAGCTTGGTAGAATCGATCAGCTACCTCTAACAAACAGTACTTTACGATCC
<i>rpsI</i>	forward reverseconv reverseRT	TGAATCACGAGTAAGTAGGCC AGATTACATCCCATTTGCAGC CAGCTTGGTAGAATCGATCAGCTACAGATTACATCCCATTTGCAGC
<i>infA</i>	forward reverseconv reverseRT	CTACTGTCACTTTATCTCCAGG GTAGTACAAGAACTCTACCAAACG CAGCTTGGTAGAATCGATCAGCTACGTAGTACAAGAACTCTACCAAACG
<i>all</i>	reverseDNF	CAGCTTGGTAGAATCGATCAGCTAC

4.5 Experimentos secundários envolvendo as principais variáveis do qPCR

4.5.1 Uso de primers taguados e a eliminação da degradação de mRNA e da contaminação com DNA genômico

Calculando-se a razão entre as concentrações de RNA total, antes e após a realização do tratamento com DNase I, obteve-se em média uma concentração 14% menor de RNA total nas amostras, conforme demonstrado na Tabela 23.

Tabela 23 – Comparação entre as concentrações de RNA total obtidas por espectrofotometria NanoDrop. Fonte: O autor

C_{RNA} (ng/ μ L)	21X5	22X5	23X5	média	desvpad
pós DNase/pré DNase	0,84	0,86	0,88	0,86	0,02

Adicionalmente, adotando-se 7.000 como valor de *threshold* e submetendo-se após a transcrição reversa cada uma das alíquotas à amplificação por qPCR, foram obtidos os valores de Ct indicados na Tabela 24. Oportuno salientar que os valores relativos ao gene *16S rRNA* foram excluídos desta análise, em razão do valor de *threshold* a ser adotado diferir do adotado para os demais genes. Foi utilizado o gene *virR* como normalizador, conforme resultado do algoritmo NormFinder.

Tabela 24 – Valores de Ct obtidos após transcrição reversa das alíquotas. Fonte: O autor

Ct	<i>prfA</i>	<i>sigB</i>	<i>ctsR</i>	<i>lexA</i>	<i>recA</i>	<i>dnaA</i>	<i>virR</i>	<i>sod</i>	<i>kat</i>	1433	<i>rpoD</i>	<i>rpsL</i>	<i>infA</i>
21X5 DNF	23,21	20,53	22,24	24,66	21,54	22,34	23,14	23,27	23,45	23,97	24,37	23,88	24,38
22X5 DNF	23,85	21,62	22,59	25,26	21,60	22,55	23,59	23,40	23,72	24,61	24,11	24,56	24,25
23X5 DNF	21,33	19,91	21,23	22,30	19,80	21,27	21,72	20,64	21,58	22,51	23,03	21,90	23,53
21X5 CONV	30,90	24,03	23,79	30,25	25,67	26,02	29,44	31,91	28,34	32,24	31,66	32,33	33,69
22X5 CONV	25,65	21,12	23,36	26,75	21,73	23,75	26,35	27,41	26,83	26,28	28,89	27,81	30,48
23X5 CONV	22,84	17,99	18,82	24,73	18,98	19,72	23,03	25,33	23,54	24,41	23,53	25,94	26,63
média DNF	22,80	20,68	22,02	24,07	20,98	22,05	22,82	22,44	22,92	23,70	23,84	23,45	24,05
média CONV	26,46	21,05	21,99	27,24	22,13	23,16	26,28	28,22	26,24	27,65	28,03	28,70	30,27
razão CONV/DNF	1,16	1,02	1,00	1,13	1,05	1,05	1,15	1,26	1,14	1,17	1,18	1,22	1,26

Para melhor visualização, os valores obtidos para as razões CONV/DNF são apresentados de forma gráfica na Figura 55.

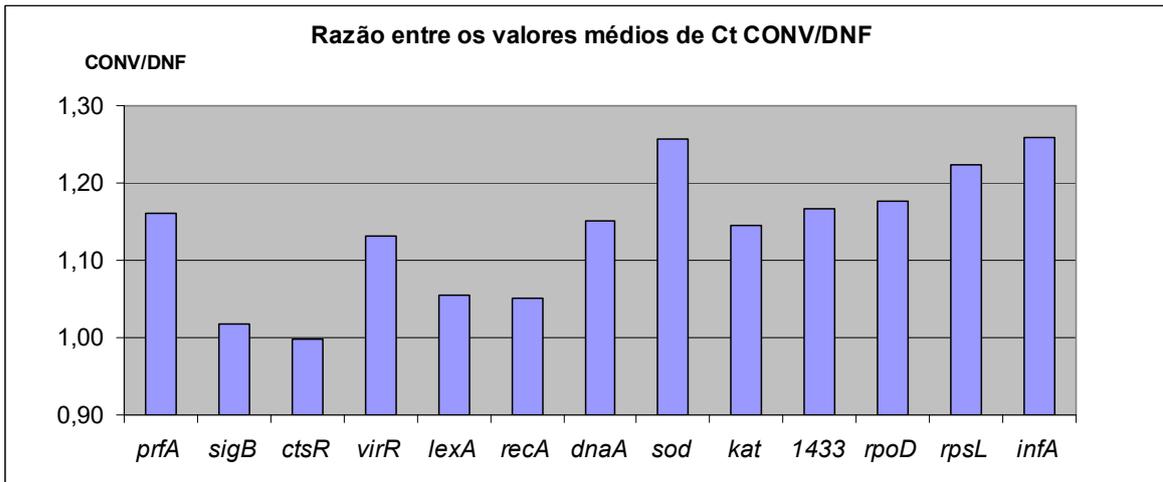


Figura 55 – Variação da razão entre os valores médios de Ct. Fonte: O autor

Por fim, é apresentado nas Figuras 56, 57 e 58 os resultados do qPCR comparando o uso da metodologia com primers tagueados (situação calibradora) e primers convencionais (situação questionada) para as amostras 21X5, 22X5 e 23X5, respectivamente.

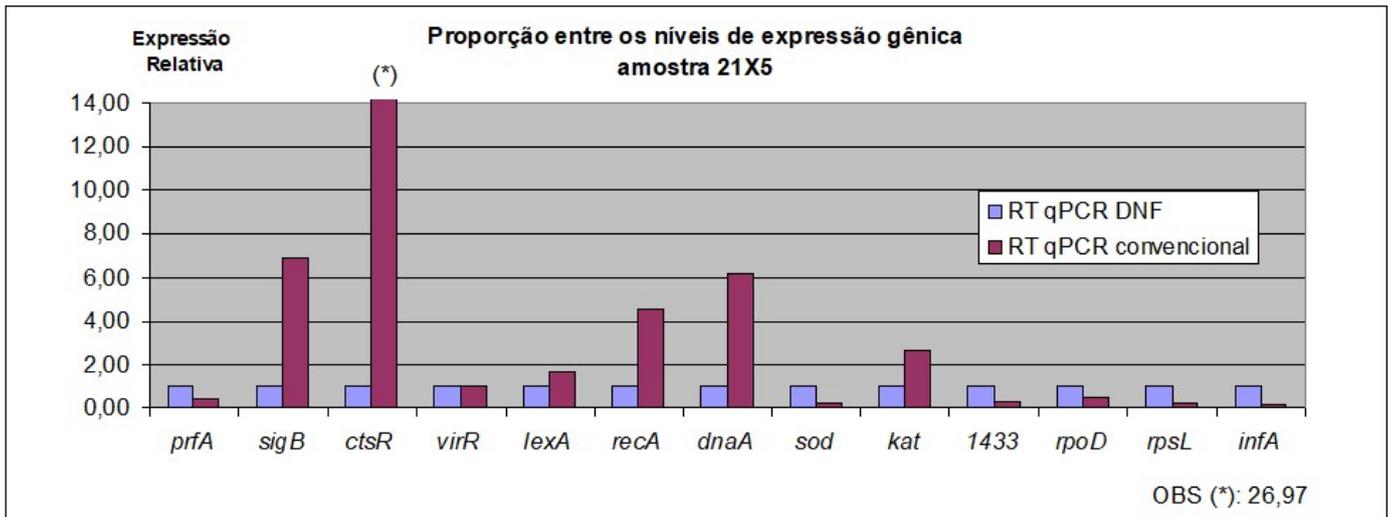


Figura 56 – Resultados do qPCR comparando o uso de primers tagueados e convencionais para a amostra 21X5. Fonte: O autor

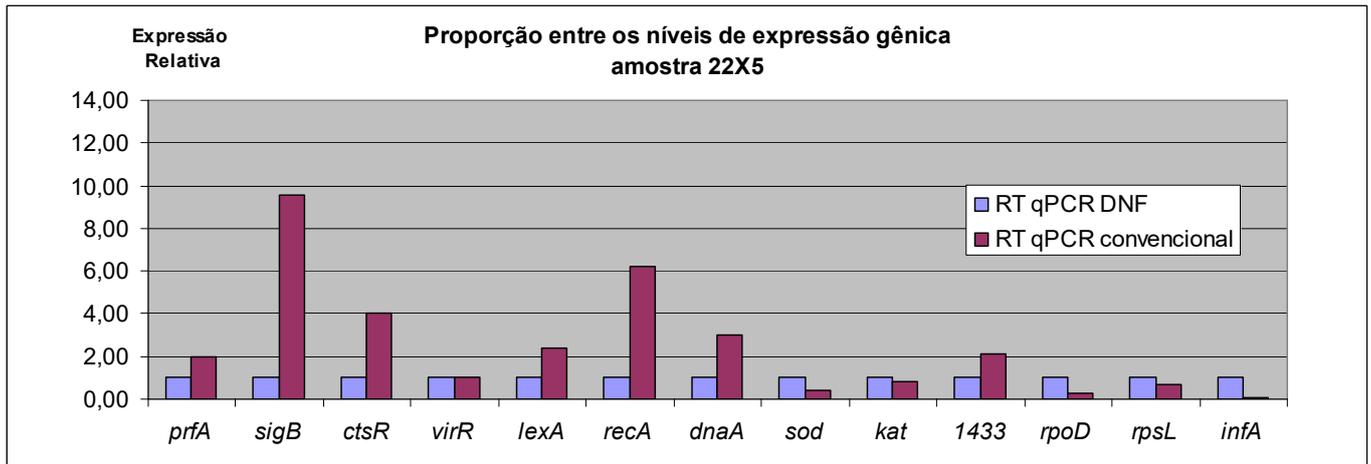


Figura 57 – Resultados do qPCR comparando o uso de primers tagueados e convencionais para a amostra 22X5. Fonte: O autor

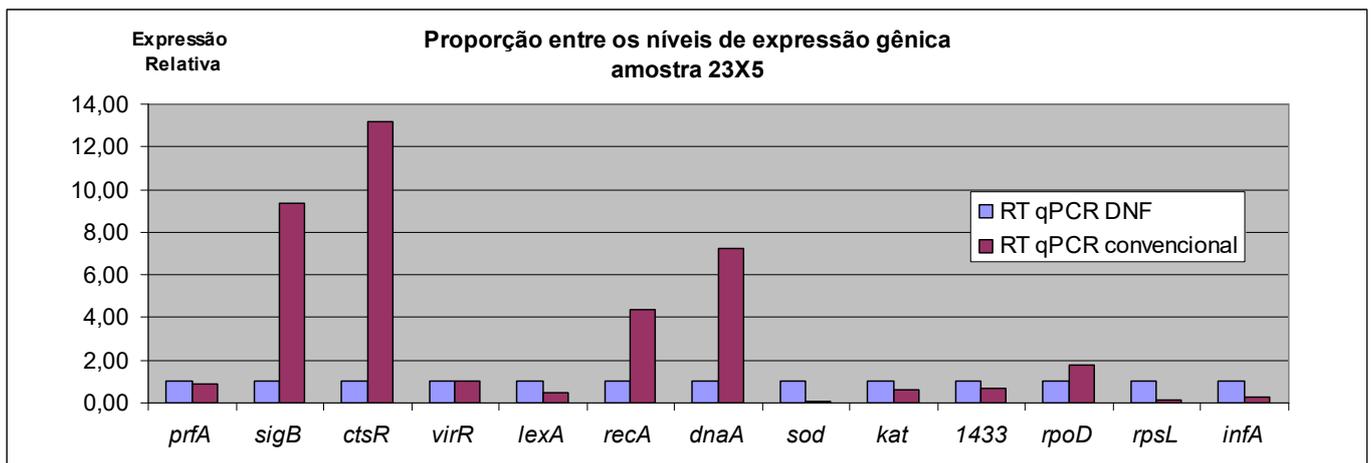


Figura 58 – Resultados do qPCR comparando o uso de primers tagueados e convencionais para a amostra 23X5. Fonte: O autor

4.5.2 Definição da *thresholdline* e a redução dos erros associados

Mediante a realização do experimento secundário descrito no cap. 3.8.3, foram selecionados alguns resultados que melhor exemplificam a importância de uma escolha cuidadosa do valor de *threshold*, os quais são apresentados a seguir. A Figura 59 apresenta os resultados obtidos para o gene *sod* na amostra 22X3, arbitrando-se como valores de *threshold* 4.000, 6.000, 8.000 e 12.000. Resultados correspondentes para o gene *recA* na amostra 22X3, incluindo porém,

o valor de *threshold* 2.000, são apresentados na Figura 60 e para o gene *sod* na amostra 21X3, na Figura 61. Em algumas curvas de amplificação, pontos de inflexão específicos foram identificados através das letras A, B e C, a fim de subsidiar a discussão a ser realizada no capítulo 5.3.2.

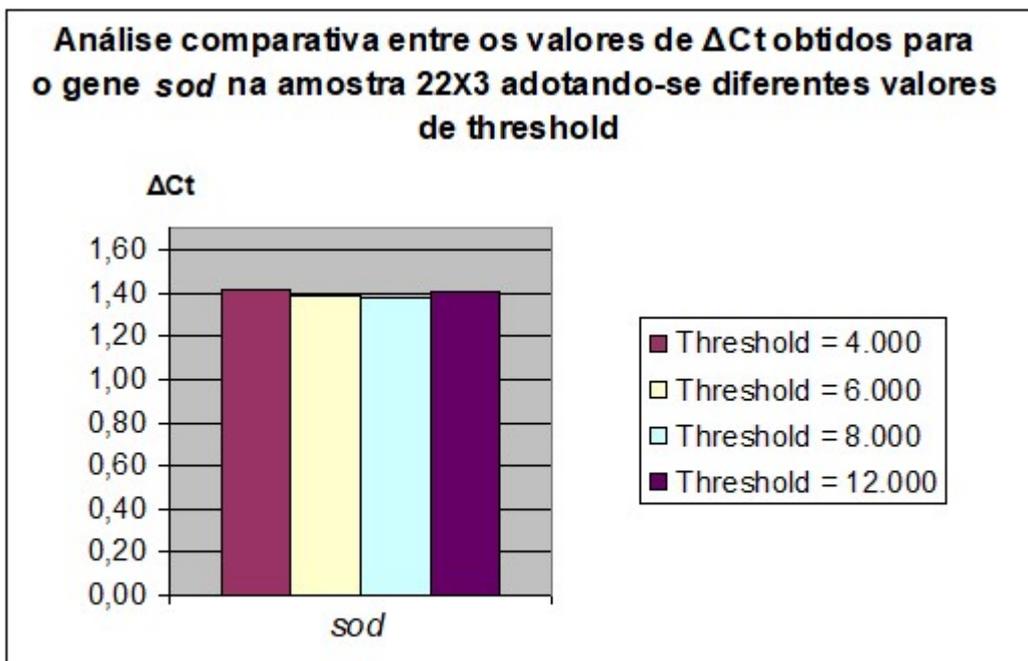
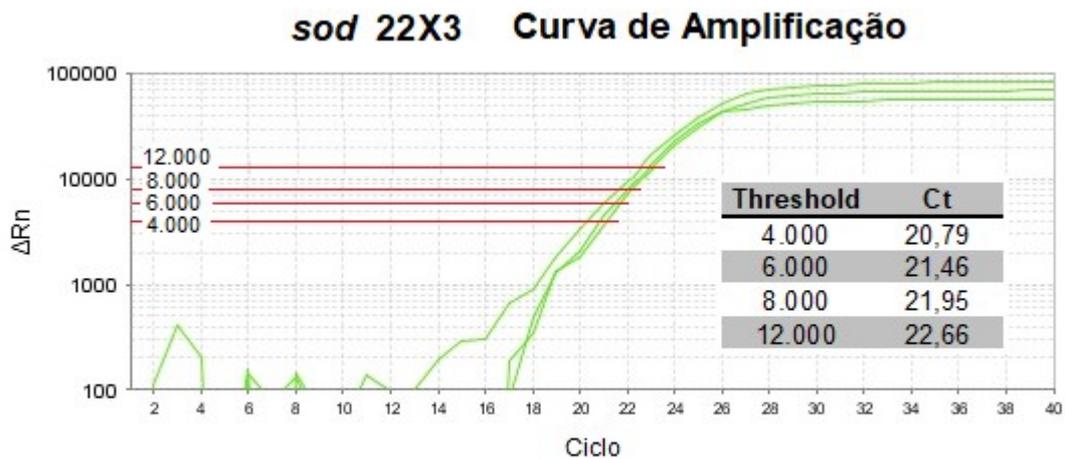
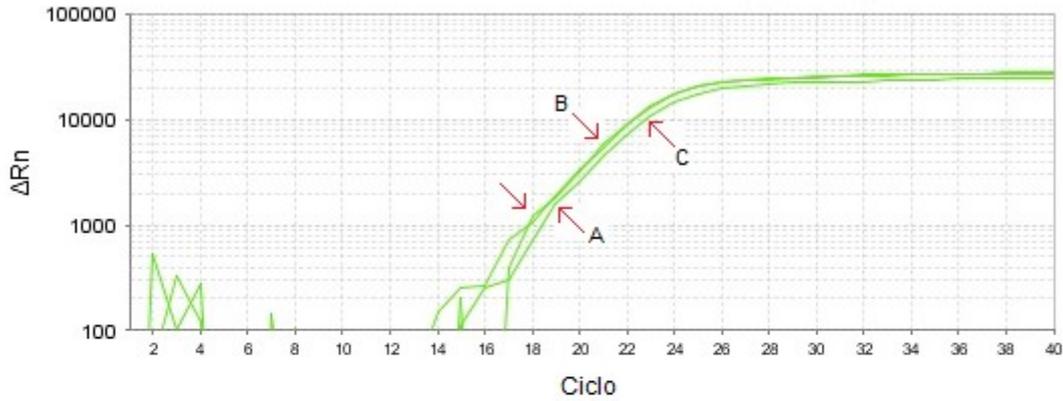
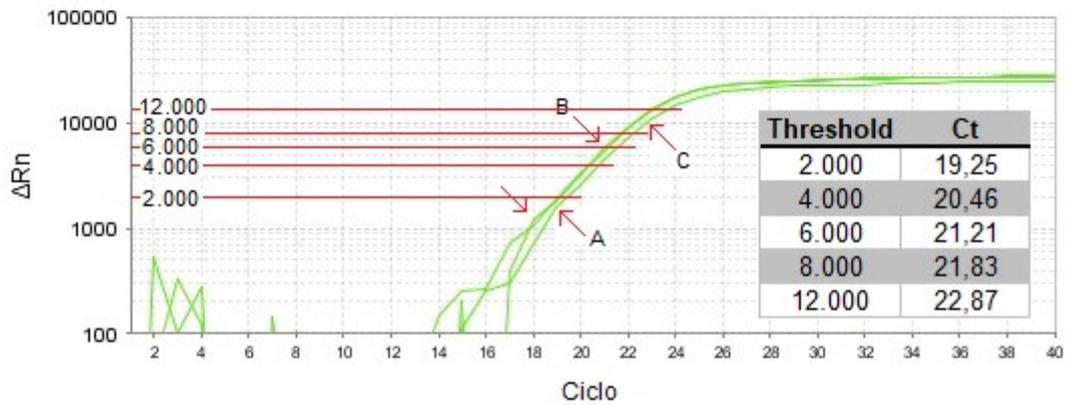


Figura 59 – Resultados obtidos para o gene *sod* na amostra 22X3. Fonte: O autor

recA 22X3 Curva de Amplificação



recA 22X3 Curva de Amplificação



Análise comparativa entre os valores de ΔCt obtidos para o gene *recA* na amostra 22X3 adotando-se diferentes valores de threshold

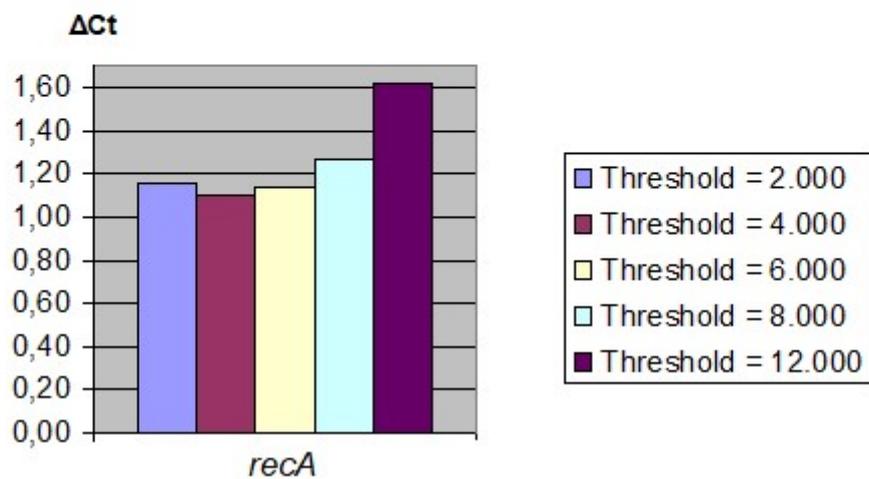


Figura 60 – Resultados obtidos para o gene *recA* na amostra 22X3. Fonte: O autor

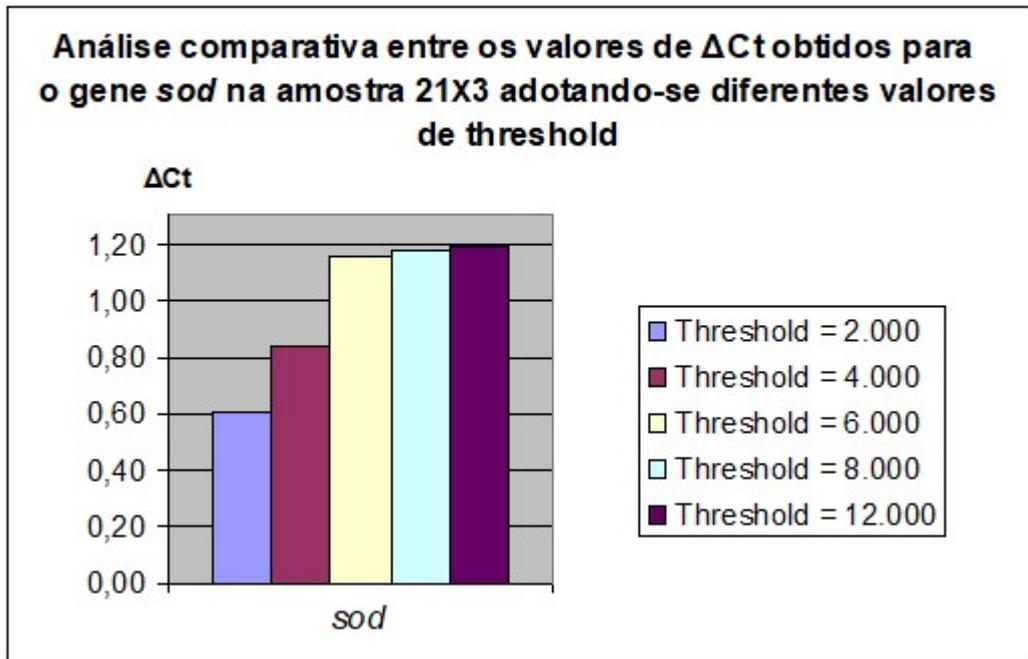
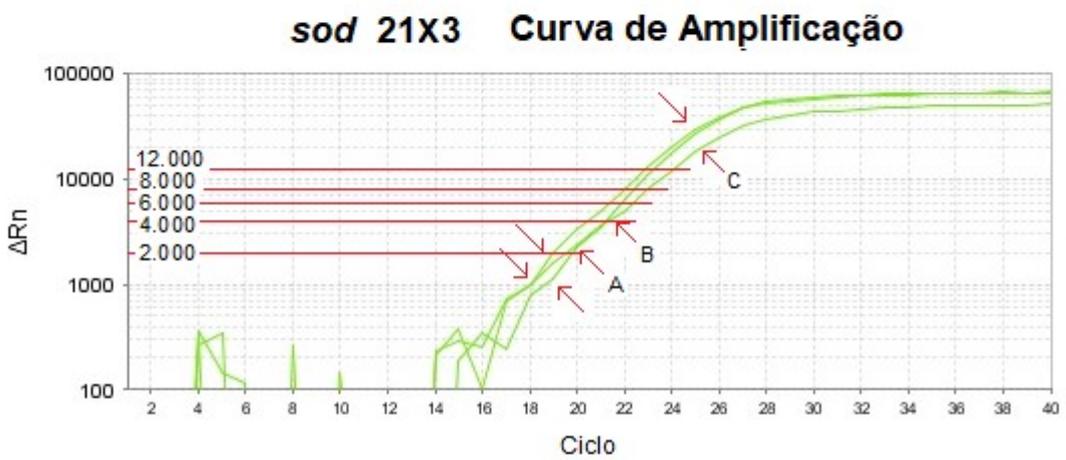
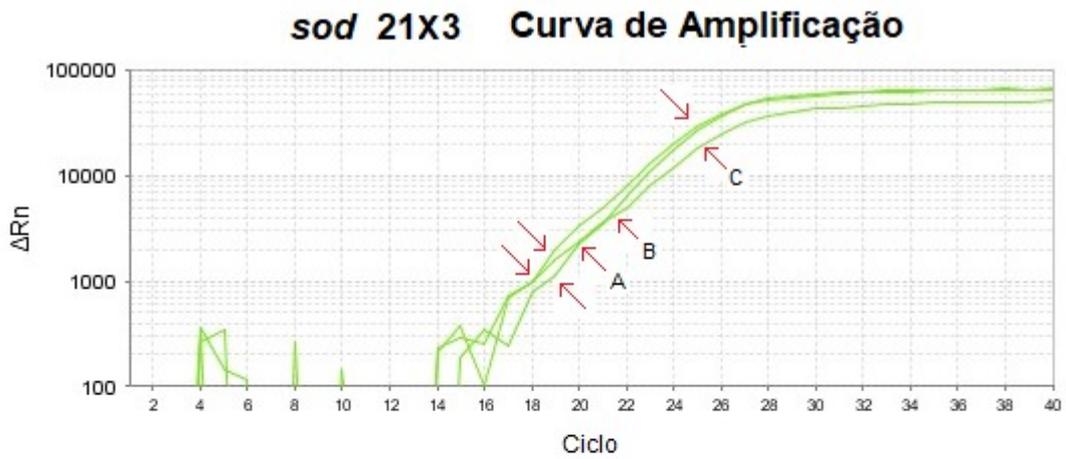


Figura 61 – Resultados obtidos para o gene *sod* na amostra 21X3. Fonte: O autor

A normalização dos valores de Ct, foi realizada utilizando-se como normalizador o gene *infA*, identificado através do algoritmo NormFinder. Os valores de $\Delta\Delta Ct$ foram calculados considerando-se os valores de ΔCt relativos a *threshold* 4.000 como situação calibradora e aqueles relativos a outros valores de *threshold* como situação questionada. Os resultados obtidos através do qPCR são apresentados na Tabela 25 e discutidos no cap. 5.3.2.

Tabela 25 – Resultados do qPCR para replicatas 2XX3, utilizando diferentes valores de *threshold*. Fonte: O autor

$2^{-\Delta\Delta Ct}$	<i>prfA</i>	<i>sigB</i>	<i>ctsR</i>	<i>lexA</i>	<i>recA</i>	<i>dnaA</i>	<i>virR</i>	<i>sod</i>	<i>kat</i>	1433	<i>rpoD</i>	16S	<i>rpsL</i>	<i>infA</i>
21X3/4k	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
21X3/2k	0,99	0,90	0,92	1,16	1,00	1,17	1,74	1,17	1,00	0,82	1,37	1,01	1,15	1,00
21X3/6k	0,87	0,90	0,89	0,79	0,83	0,66	0,32	0,80	0,88	0,82	0,80	0,89	0,86	1,00
21X3/8k	0,88	0,93	0,94	0,74	0,79	0,39	-	0,79	0,91	0,83	0,79	0,97	0,89	1,00
21X3/12k	0,86	0,90	0,97	0,64	0,60	-	-	0,78	0,95	0,86	0,79	1,07	0,92	1,00
22X3/4k	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
22X3/2k	0,95	0,99	0,93	1,11	0,96	1,10	1,45	0,88	1,03	0,89	0,91	1,43	0,89	1,00
22X3/6k	1,01	0,97	1,03	0,93	0,97	0,83	0,47	1,02	1,01	1,03	1,04	1,00	1,02	1,00
22X3/8k	0,98	0,94	1,01	0,88	0,89	0,62	-	1,03	1,00	1,06	1,03	1,01	1,02	1,00
22X3/12k	0,92	0,86	0,99	0,74	0,70	0,08	-	1,01	1,01	1,08	1,04	1,02	1,02	1,00
23X3/4k	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
23X3/2k	1,06	0,86	1,01	1,04	0,80	0,78	1,84	1,04	1,13	1,14	1,43	-	0,94	1,00
23X3/6k	0,91	1,02	1,04	0,89	1,21	0,85	0,32	1,16	0,91	0,86	0,83	1,14	0,90	1,00
23X3/8k	0,86	1,02	1,31	0,80	1,12	0,63	-	1,06	0,86	0,78	0,75	1,08	0,85	1,00
23X3/12k	0,75	0,94	1,20	0,64	0,89	-	-	0,93	0,78	0,70	0,64	1,05	0,80	1,00

Em consonância com as recomendações realizadas no cap. 3.8.3, a adequação dos valores de *threshold* definidos automaticamente pelo software do termociclador (7500 software v. 2.0.6 da Applied Biosystems) para os dados do presente estudo, foi cuidadosamente verificada a partir da análise das curvas de amplificação, tendo sido mantidos os valores sugeridos apresentados na Tabela 26.

Tabela 26 – Valores de *threshold* automaticamente definidos pelo software do termociclador e utilizados no presente estudo, para as condições experimentais nisina livre (NL), lipossomo branco (LB) e lipossomo de nisina (LN). Fonte: O autor

Gene	Condição Experimental	
	NL	LB/LN
<i>prfA</i>	5.678	8.859
<i>sigB</i>	4.650	3.947
<i>ctsR</i>	5.724	-
<i>lexA</i>	-	-
<i>recA</i>	-	-
<i>dnaA</i>	-	4.154
<i>virR</i>	-	3.008
<i>sod</i>	-	-
<i>kat</i>	10.731	-
1433	12.807	14.412
<i>rpoD</i>	8.475	8.617
16S	20.074	21.992
<i>rpsL</i>	11.948	10.002
<i>infA</i>	11.369	16.206

Para os demais genes e condições experimentais, também com base nas curvas de amplificação, foram definidos valores de *threshold* mais adequados, os quais são apresentados na Tabela 27.

Tabela 27 – Valores de *threshold* definidos com base na análise das curvas de amplificação, para as condições experimentais nisina livre (NL), lipossomo branco (LB) e lipossomo de nisina (LN). Fonte: O autor

Gene	Condição Experimental	
	NL	LB/LN
<i>prfA</i>	-	-
<i>sigB</i>	-	-
<i>ctsR</i>	-	8.000
<i>lexA</i>	4.000	4.000
<i>recA</i>	3.000	3.000
<i>dnaA</i>	3.000	-
<i>virR</i>	2.000	-
<i>sod</i>	4.000	3.000
<i>kat</i>	-	1.000
1433	-	-
<i>rpoD</i>	-	-
16S	-	-
<i>rpsL</i>	-	-
<i>infA</i>	-	-

A Figura 62 exemplifica o reposicionamento da linha de *threshold* relativa ao gene *dnaA* na condição experimental nisina livre concentração de 100 mg/L, para um valor mais adequado, baseando-se na análise das curvas de amplificação.

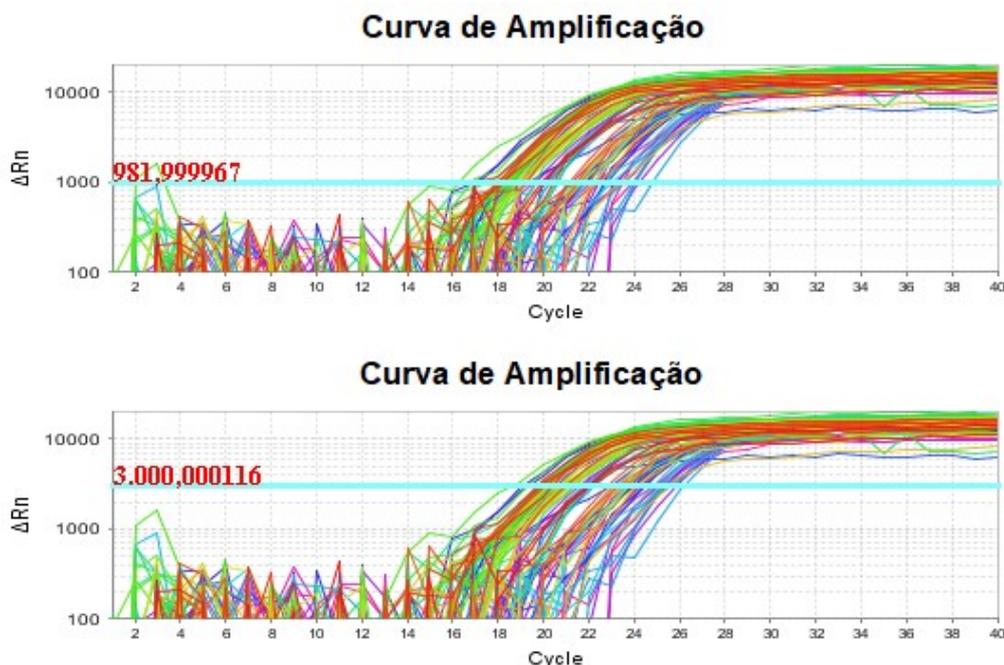


Figura 62 – Exemplo de valores de *threshold* para o gene *dnaA* – condição experimental nisina livre concentração de 100 mg/L, definidos automaticamente pelo software (acima) e após análise das curvas de amplificação (abaixo). Fonte: O autor

Já a Figura 63 demonstra uma melhora típica nos valores de Ct extraídos de um conjunto de replicatas técnicas, relativas ao gene *ctsR*, condição experimental nisina nanoencapsulada, amostra 43X4, após reposicionamento da linha de *threshold* para um valor mais adequado.

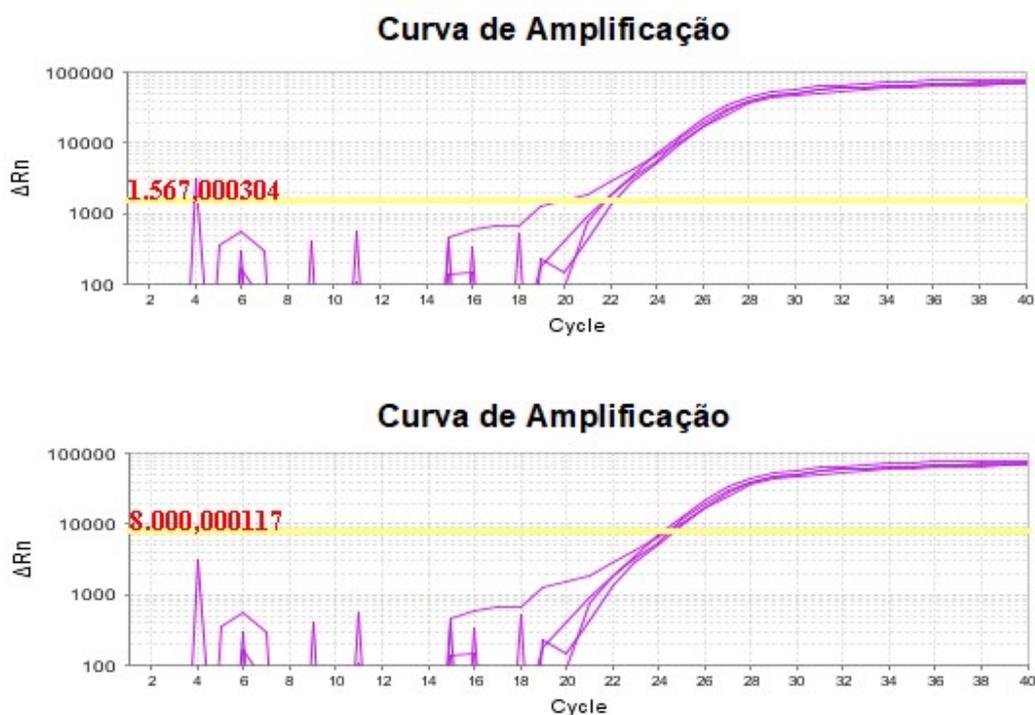


Figura 63 – Comparação entre valores de Ct extraídos para o gene *ctsR*, condição experimental nisina nanoencapsulada, amostra 43X4, utilizando valor de *threshold* definido automaticamente pelo software (acima) e definido a partir da análise das curvas de amplificação (abaixo). Fonte: O autor

Além disso, com base na análise das curvas de amplificação, também foram eliminadas no presente estudo, do cálculo da média dos valores de Ct entre as replicatas técnicas, as replicatas que apresentaram comportamento discordante das demais. A Figura 64 exemplifica o caso descrito, ocorrido para a replicata 3343, na análise do gene *prfA*, condição experimental lipossomo branco, onde se observa uma única curva de amplificação discordante das demais, as quais se apresentam bastante coesas entre si.

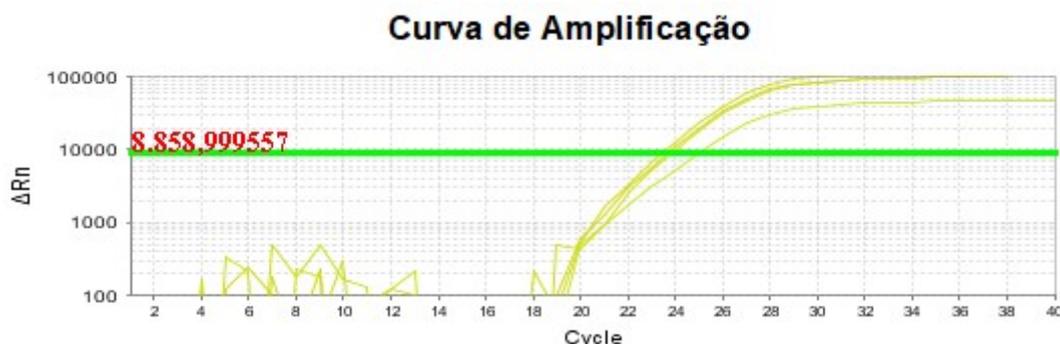


Figura 64 – Exemplo de curva de amplificação discordante das demais replicatas técnicas, obtida para o gene *prfA*, condição experimental lipossomo branco, replicata 3343. Fonte: O autor

4.5.3 Curvas de *melting* e a detecção de produtos de amplificação indesejados

Para fins do presente trabalho, foi estabelecida uma classificação para as curvas de *melting*, composta por 5 subgrupos possíveis, conforme indicado na Figura 65.

Cada uma das curvas de *melting* decorrentes das reações de qPCR (2.418 no total) foram categorizadas conforme a classificação apresentada na Figura 65, resultando nas estatísticas apresentadas na Tabela 28. Todas as curvas de amplificação, associadas às curvas de *melting* com classificação diferente de tipo1 foram excluídas do presente estudo, previamente ao cálculo da média dos valores de Ct entre as replicatas técnicas.

Tabela 28 – Estatística da classificação das curvas de *melting*. Fonte: O autor

Tipo	<i>prfA</i>	<i>sigB</i>	<i>ctsR</i>	<i>lexA</i>	<i>recA</i>	<i>dnaA</i>	<i>virR</i>	<i>sod</i>	<i>kat</i>	1433	<i>rpoD</i>	<i>rpsL</i>	<i>infA</i>
1	82,80%	62,90%	90,86%	82,80%	29,03%	90,32%	90,32%	60,22%	92,47%	98,92%	96,77%	87,63%	96,77%
2	1,08%	0,00%	1,08%	2,15%	0,00%	0,00%	1,08%	0,00%	0,00%	0,54%	0,00%	0,00%	0,00%
3	16,13%	34,41%	5,38%	12,37%	27,96%	6,99%	5,91%	38,71%	6,45%	0,00%	2,15%	11,83%	2,69%
4	0,00%	2,69%	2,15%	2,69%	43,01%	2,69%	1,61%	1,08%	1,08%	0,54%	1,08%	0,54%	0,54%
5	0,00%	0,00%	0,54%	0,00%	0,00%	0,00%	1,08%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
Total	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%
Curvas	186	186	186	186	186	186	186	186	186	186	186	186	186

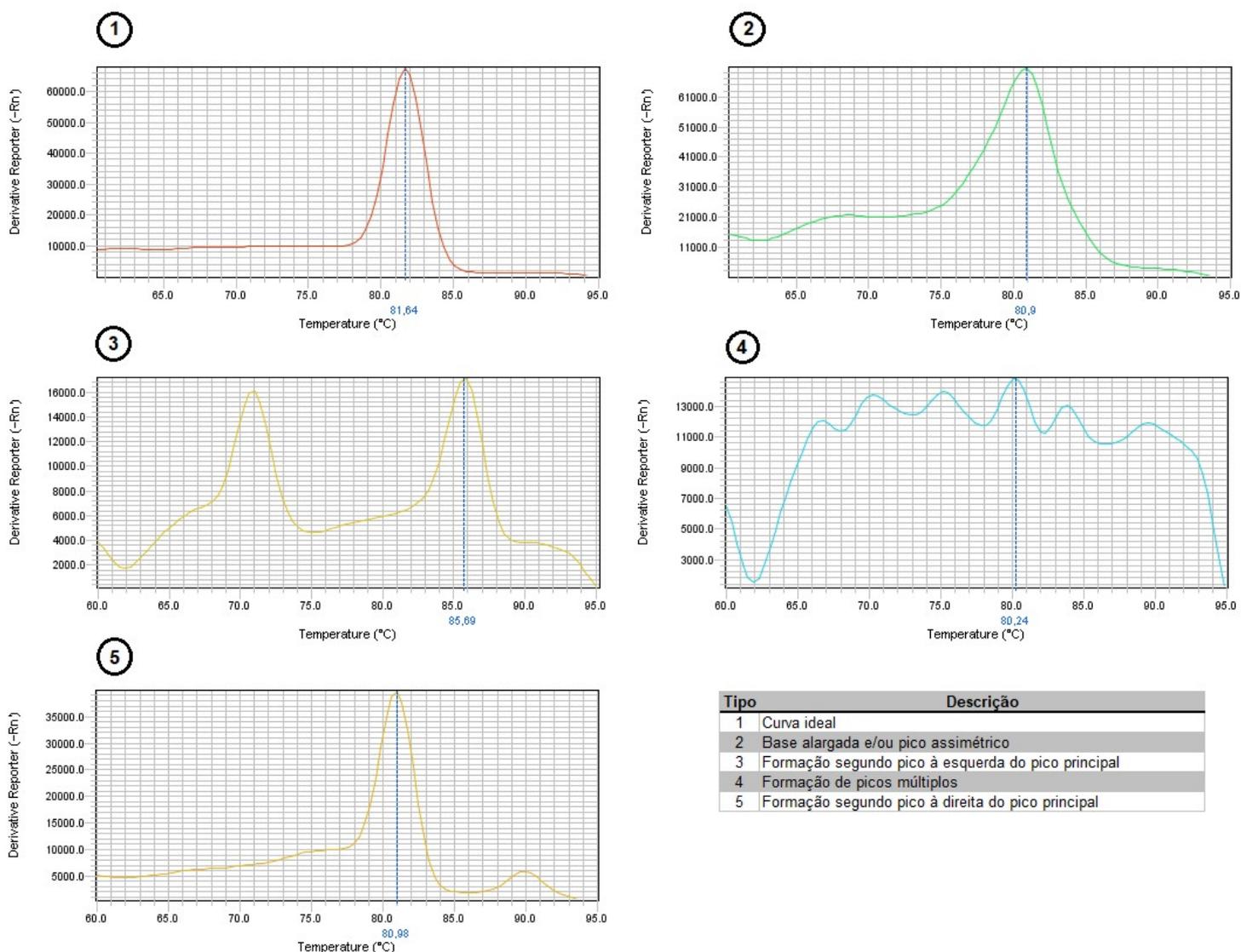


Figura 65 – Classificação adotada para as curvas de *melting*. Fonte: O autor

As médias resultantes dos valores de Ct entre as replicatas técnicas são apresentadas no Apêndice VII – Médias dos valores de Ct entre replicatas técnicas.

Como consequência da discussão realizada no cap. 5.3.3, os pares de primers projetados para os genes *sigB*, *recA* e *sod* foram reavaliados através do software AUTODIMER versão 2017, a fim de verificar a capacidade de predição deste programa. Os valores máximos de score obtidos são sintetizados na Tabela 29. As características do dímero de primers e autodobramento de maior score, relativos ao gene *recA*, são apresentadas na Figura 66.

Tabela 29 – Scores máximos obtidos através do programa AUTODIMER para os primers dos genes *sod*, *sigB* e *recA*. Fonte: O autor

Gene	Primers			
	Forward e reverse all		Forward, reverse tagueado e reverse all	
	dímero de primers	auto-dobramento	dímero de primers	auto-dobramento
<i>sod</i>	1	1	2	3
<i>sigB</i>	3	1	3	2
<i>recA</i>	2	1	5	4

Primer Dimer Results

Sequences	Match Sequence	Matches	Score	Est. Tm (°C)	ΔG (@ 37.0 °C) (kcal/mol)	Lineup
1608779838402-3 CAGCTTGGTAGAATCGATCAGCTACCAATCTCTAAAGCTTGTCTCC vs 1608779838402-1 CGTTAGATATTGCTTTAGGAGTTGG	NNAGANNNGCTTTAGNNNTGG	14	5	15.2	-3.0	3' - CCTCTTGGTTGAAATCTCTAACCATCGACTAGCTAAGATGGTTCGAC - 5' xx xxxx xxx 5' - CGTTAGATATTGCTTTAGGAGTTGG - 3'

Hairpin Results

Sequence	Match Sequence	Matches	Score	Est. Tm (°C)	ΔG (@ 37.0 °C) (kcal/mol)	Lineup
1608779838402-3 CAGCTTGGTAGAATCGATCAGCTACCAATCTCTAAAGCTTGTCTCC	NNNCTACCAANCTN	9	4	29.5	-6.6	GCTAAGATGGTTCGAC - 5' { XXX X X ATCAGTACCAATCTCTAAAGCTTGTCTCC - 3'

Figura 66 – Predição da formação de dímeros de primers e autodobramentos para os primers *forward*, *reverse* tagueado e *reverse all* do gene *recA*, realizada através do programa AUTODIMER. Fonte: O autor

4.5.4 Genes normalizadores

Em decorrência da exclusão de algumas replicatas técnicas do estudo, após análise das respectivas curvas de *melting*, resultaram lacunas na matriz de dados de entrada para os algoritmos de normalização. Ocorre que os algoritmos não são executados com a presença destas lacunas, nem com o preenchimento destas com zero, uma vez que isto resultaria numa indefinição matemática durante a realização das divisões internas. Por outro lado, o preenchimento destas lacunas com quaisquer outros valores, impactaria os resultados obtidos, possivelmente não indicando o normalizador correto. Idealmente, a solução seria otimizar as reações de PCR que foram excluídas e refazê-las a fim de se obter todos os dados necessários. Porém, tendo em vista que não se dispunha de tempo para retorno às atividades de bancada para realização da otimização das reações de PCR, assim como tendo em vista a quantidade relativamente grande

de amostras (entenda-se condição experimental, *time-point* de extração e replicata biológica) com dados completos, optou-se em excluir as amostras que possuíam dados incompletos, assim como os dados relativos ao gene *sigB* (uma vez que não se dispõe de dados relativos às condições experimentais lipossomo branco e nisina nanoencapsulada para este gene) e rodar os algoritmos de normalização apenas com os dados restantes (36 amostras com resultados completos para 10 genes), aplicando posteriormente a normalização obtida também às amostras incompletas. A classificação obtida para todos os genes (tanto os candidatos a normalizadores como os genes alvo), através de cada um dos algoritmos é apresentada em ordem decrescente de estabilidade na Tabela 30. Cumpre ainda ressaltar que o algoritmo NormFinder foi executado sem a definição de grupos, em consonância com os demais algoritmos que não exigem esta informação, uma vez que seria necessária a exclusão de amostras adicionais para obtenção de grupos com a mesma quantidade de amostras.

Tabela 30 – Classificação dos genes em ordem decrescente de estabilidade. Observa-se que os genes *rpsL* e *rpoD* são apontados por dois dos algoritmos como os genes mais estáveis. Fonte: O autor

	NormFinder		BestKeeper		GeNorm	
1	<i>rpsL</i>	0,212	<i>virR</i>	1,516	<i>rpoD</i>	0,037
2	<i>rpoD</i>	0,225	<i>kat</i>	1,563	<i>rpsL</i>	0,039
3	<i>prfA</i>	0,318	<i>dnaA</i>	1,579	<i>lexA</i>	0,040
4	1433	0,322	<i>ctsR</i>	1,592	<i>prfA</i>	0,041
5	<i>lexA</i>	0,403	<i>rpoD</i>	1,671	<i>kat</i>	0,043
6	<i>kat</i>	0,411	1433	1,708	<i>dnaA</i>	0,054
7	<i>dnaA</i>	0,642	<i>rpsL</i>	1,722	<i>infA</i>	0,060
8	<i>infA</i>	0,862	<i>prfA</i>	1,786	<i>virR</i>	0,065
9	<i>virR</i>	0,942	<i>lexA</i>	1,858	<i>ctsR</i>	0,068
10	<i>ctsR</i>	0,947	<i>infA</i>	1,908	1433	143,335

Em particular, o algoritmo GeNorm apontou ainda que a combinação dos genes *rpoD* e *rpsL* apresenta maior estabilidade que o gene *rpoD* isoladamente, conforme se observa na Figura 67, onde ao se repetir a análise sucessivas vezes, retirando-se a cada uma delas o gene menos estável, restaram por fim, somente os genes *rpoD* e *rpsL*, resultando numa estabilidade média de 0.022, inferior portanto, ao valor de 0.037 obtido para o gene *rpoD* isoladamente. Além disso,

não foi demonstrado qualquer aumento de estabilidade ao ampliarmos a combinação de genes de 2 para 3.

Assim, em alinhamento aos aspectos discutidos no cap. 5.3.4, para fins do presente estudo, foi adotado como fator de normalização, a média aritmética entre os valores de Ct obtidos para os genes *rpoD* e *rpsL* e como valor de *threshold* do fator de normalização, a média aritmética entre os valores de *threshold* definidos para os mesmos genes.

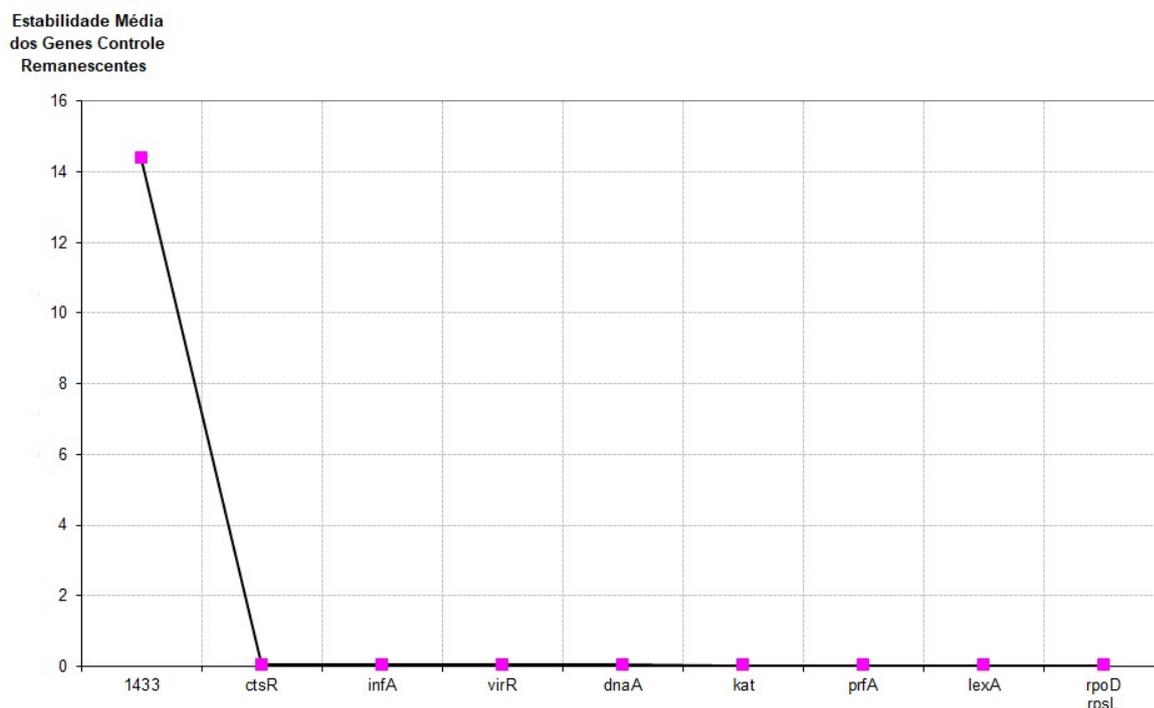


Figura 67 – Estabilidade média dos genes controle remanescentes após análises sucessivas do algoritmo GeNorm. Fonte: O autor

Com objetivo de mensurar o impacto da escolha de um fator de normalização incorreto, foi ainda realizada a comparação entre os valores do gene *rpoD* isoladamente (apontado como mais estável pelo algoritmo GeNorm e segundo mais estável pelo NormFinder), do gene *rpsL* isoladamente (apontado como mais estável pelo algoritmo NormFinder e segundo mais estável pelo GeNorm), do gene *virR* (apontado como mais estável pelo algoritmo BestKeeper) e do gene *kat* (apontado como segundo mais estável pelo algoritmo BestKeeper), todos em relação à média aritmética dos genes *rpoD* e *rpsL*, fator de

normalização correto para os dados. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 31. De forma bastante sintética, o uso de normalizadores incorretos resultou em valores de Ct desde 11,9% menores até 8,5% maiores que os corretos.

Tabela 31 – Diferenças máximas e mínimas encontradas pela utilização de outros normalizadores ao invés do fator de normalização correto. Fonte: O autor

Normalizador	Diferenças	
	Mín	Máx
<i>rpsL</i>	95,4%	100,4%
<i>rpoD</i>	99,6%	104,6%
<i>virR</i>	84,8%	108,5%
<i>kat</i>	88,1%	101,8%

4.5.5 Determinação da eficiência de amplificação e a redução dos erros associados

Inicialmente foram calculadas as eficiências de amplificação através das expressões apresentadas nos trabalhos de GENTLE et al. (2001), LIU & SAINT (2002) e PEIRSON et al. (2003), além das Expressões 6, 7 e 16 deduzidas no cap. 3.8.6 do presente trabalho. Todos os valores foram calculados utilizando-se 5 casas decimais após a vírgula. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 32

Tabela 32 – Eficiências obtidas através da utilização das diversas expressões apresentadas no capítulo 3.8.6. Fonte: O autor

Eficiência	GENTLE et al. (2001)	LIU et al. (2001)	PEIRSON et al. (2003)	Exp. 6	Exp. 7	Exp. 16
0,60	-1,44903	-0,99946	79.263,62137	0,60000	0,60000	0,60000
0,65	-1,50927	-0,99967	39.630,50596	0,65000	0,65000	0,65000
0,70	-1,56881	-0,99979	21.844,21845	0,70000	0,70000	0,70000
0,75	-1,62780	-0,99987	13.018,13350	0,75000	0,75000	0,75000
0,80	-1,68635	-0,99992	8.266,65464	0,80000	0,80000	0,80000
0,85	-1,74456	-0,99995	5.531,36717	0,85000	0,85000	0,85000
0,90	-1,80252	-0,99997	3.866,20864	0,90000	0,90000	0,90000
0,95	-1,86029	-0,99998	2.803,55758	0,95000	0,95000	0,95000
1,00	-1,91795	-0,99998	2.097,59240	1,00000	1,00000	1,00000
1,05	-1,97555	-0,99999	1.612,09056	1,05000	1,05000	1,05000
1,10	-2,03315	-0,99999	1.268,04339	1,10000	1,10000	1,10000

Diante destes resultados, a Expressão 7 foi escolhida para determinação da eficiência de amplificação no presente estudo, em razão de sua maior simplicidade de cálculo.

No tocante à determinação das eficiências de amplificação do presente estudo, na quase totalidade das replicatas, a região afetada pelo ruído de fundo acaba se estendendo além do platô indicado na Figura 46, sobre a região de saturação, inviabilizando desta maneira a determinação da eficiência de amplificação que caracteriza a reação de PCR. Para superar este problema, a curva teórica da eficiência de amplificação, representada na Figura 46, foi modelada através de uma função sigmoidal da família representada pela Expressão 34, cujo comportamento para uma eficiência de 100% a título de exemplo, pode ser visualizado na Figura 68.

$$f(x) = a \left(-\frac{1}{1 + b \cdot e^{-cx}} + 1 \right), \quad 0 \leq x \leq 40 \quad \text{Exp. 34}$$

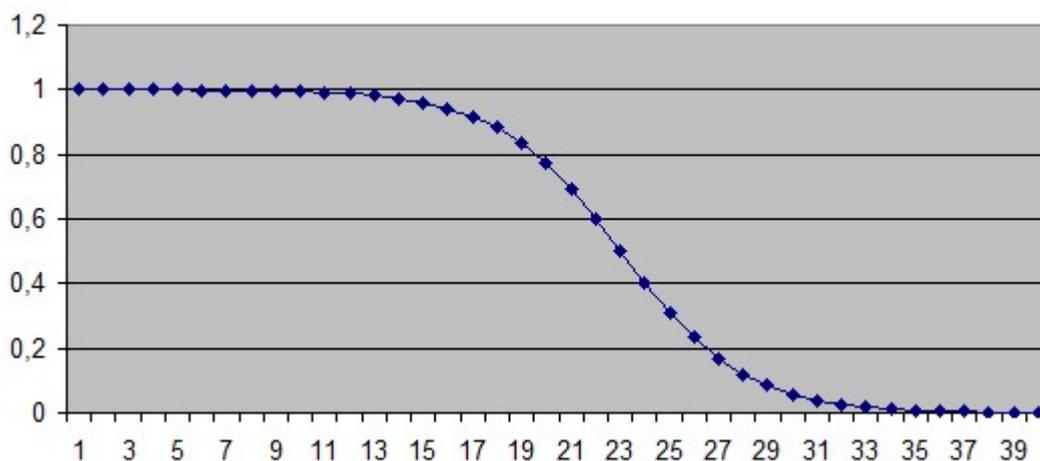


Figura 68 – Comportamento de uma função sigmoidal da família utilizada. Fonte: O autor

Os valores dos parâmetros a, b e c adequados para cada uma das 1.440 replicatas que permaneceram no estudo, foram obtidos a partir dos respectivos dados não impactados pelo ruído, por regressão não linear sigmoidal, realizada pelo método dos mínimos quadrados. Para esse propósito foi elaborado um código em Visual Basic for Applications (VBA), o qual é apresentado no Apêndice VIII – Rotina computacional elaborada para análise gráfica e regressão não linear sigmoidal do presente trabalho. A Figura 69 exemplifica a qualidade do ajuste

realizado. Após o ajuste dos parâmetros, foi calculado o valor da função para o ciclo inicial, fornecendo assim a eficiência da reação de amplificação.

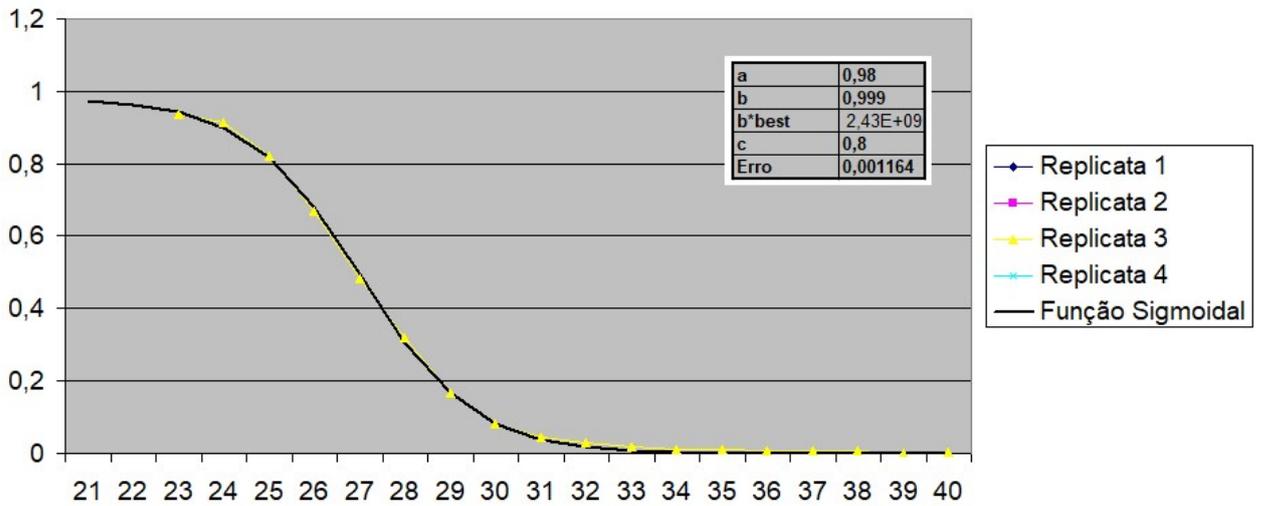
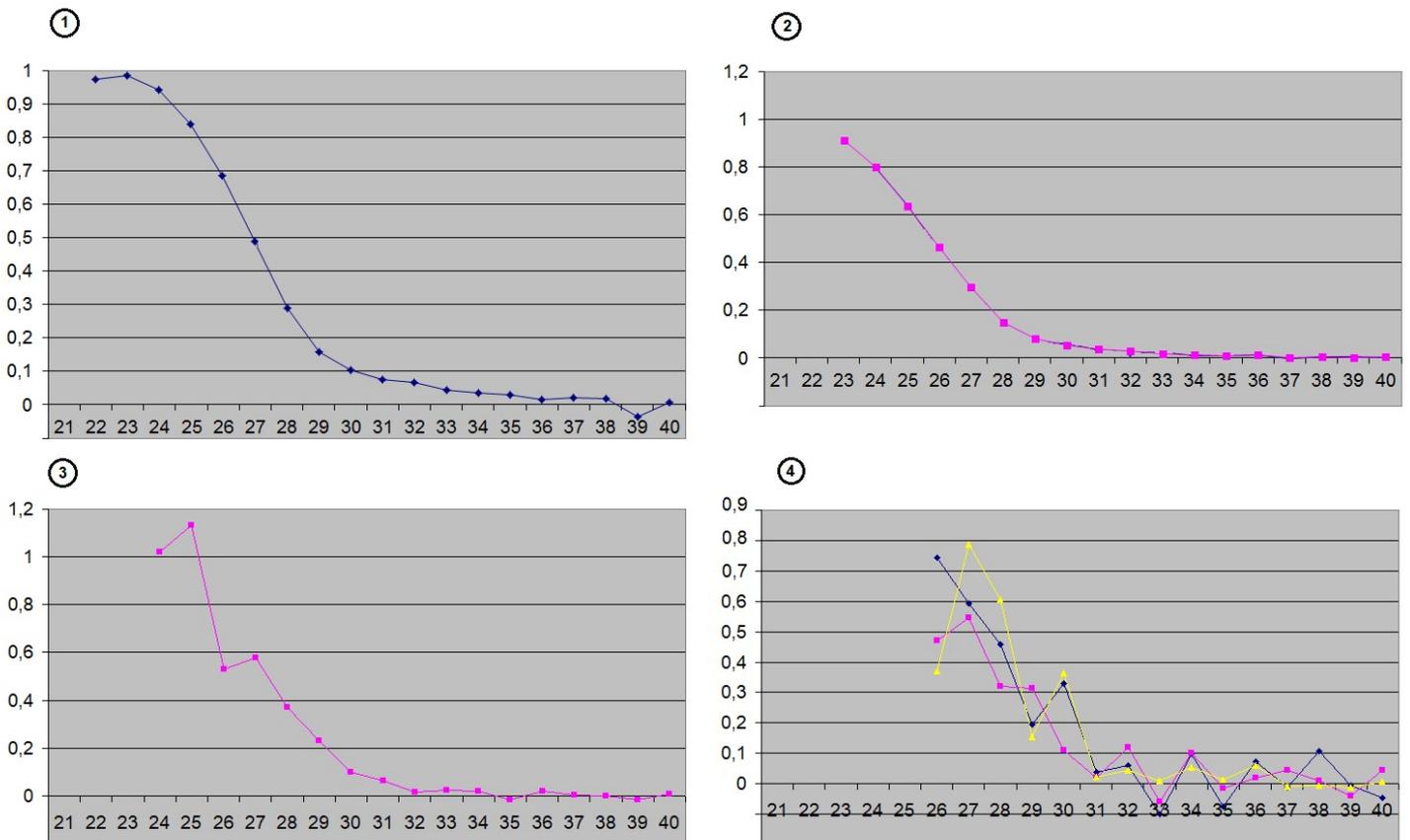


Figura 69 – Exemplo do ajuste realizado através da função sigmoidal. Fonte: O autor

Para fins do presente trabalho, foi estabelecida uma classificação para as curvas de eficiência, composta por 4 subgrupos possíveis, conforme indicado na Figura 70.



Tipo	Descrição
1	Curva completa incluindo ponto de máximo
2	Curva incompleta - contém ponto de inflexão e segunda concavidade
3	Curva incompleta - não contém ponto de inflexão, nem segunda concavidade
4	Curva afetada por ruído em toda sua extensão

Figura 70 – Classificação adotada para as curvas de eficiência. Fonte: O autor

De forma geral, embora 72,2% das curvas de eficiência obtidas no presente estudo tenham sido classificadas como tipo 2, 15,6% delas foram classificadas como tipo 3 e 10,2% como tipo 4 (sendo a ocorrência desta última categoria restrita às replicatas dos cDNAs *dnaA*, *virR* e *kat*), categorias que inviabilizam até mesmo o ajuste de uma função sigmoidal para determinação do valor correto da eficiência de amplificação. Para contornar tal dificuldade foram adotadas as seguintes diretrizes para realização das análises:

- Não há nenhuma justificativa para que haja diferença significativa entre as curvas de eficiência das replicatas técnicas de uma mesma amostra, salvo variações de pipetagem, uma vez que seu material biológico provém da mesma amostra homogeneizada e também foi utilizado o mesmo mix de PCR homogeneizado. Portanto, é esperado que as curvas sejam coincidentes ou aproximadamente coincidentes, conforme demonstrado na Figura 71

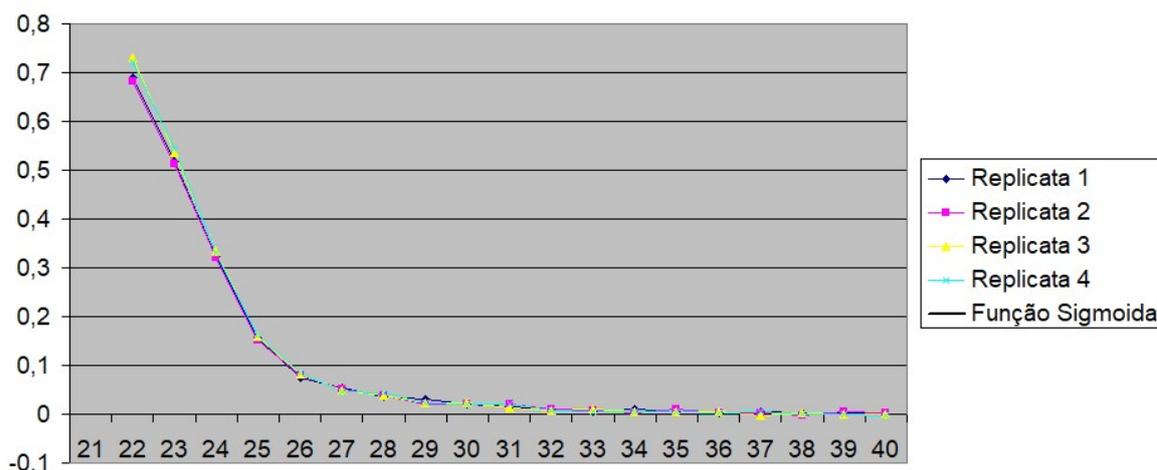


Figura 71 – Exemplo de curvas de eficiência de replicatas técnicas de uma mesma amostra.

Fonte: O autor

- Já para as replicatas de amostras distintas, desde que pertencentes à mesma condição experimental e amplificadas para o mesmo cDNA, é esperado que as curvas de eficiência estejam deslocadas ao longo do eixo x, pois uma vez que possuem quantidades iniciais do mRNA alvo distintas, a saturação e por consequência a redução da eficiência de amplificação ocorrerão em ciclos diferentes para cada replicata. Porém, uma vez que as reações de amplificação são todas para o mesmo alvo, utilizando os mesmos primers e as condições experimentais são as mesmas, salvo alterações decorrentes de variabilidade biológica, não há motivo para que as curvas de amplificação sejam diferentes entre si (mantém a mesma inclinação e convergem para mesma eficiência inicial), conforme demonstrado na Figura 72.

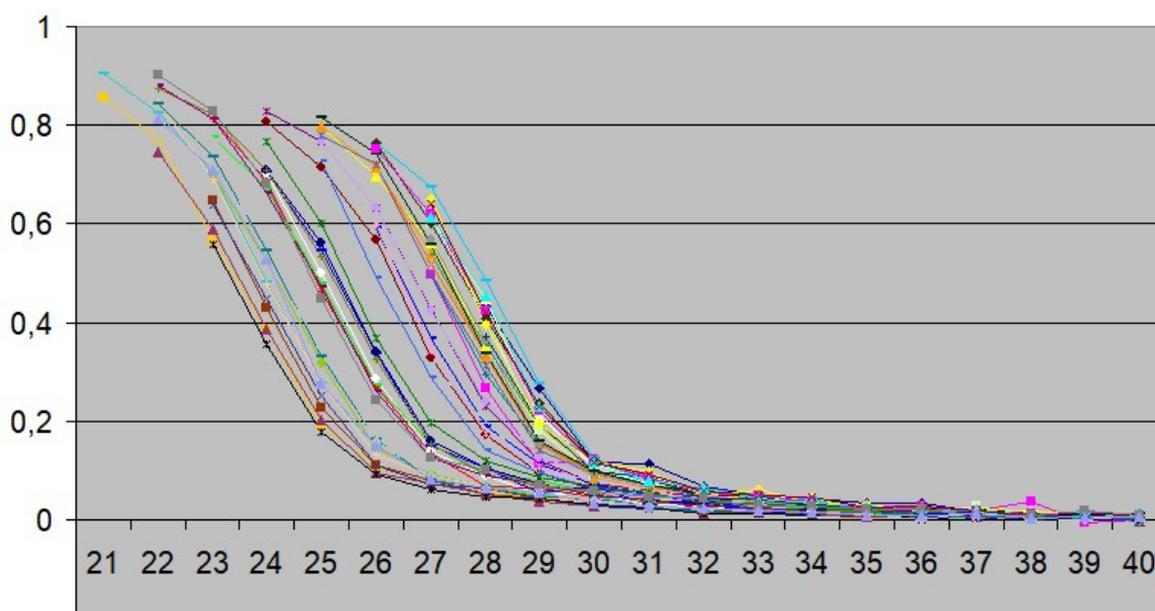


Figura 72 – Exemplo de curvas de eficiência de replicatas de amostras distintas, para uma mesma condição experimental e cDNA alvo. Fonte: O autor

Baseando-se nestas diretrizes, foi elaborado um código em VBA, o qual é apresentado no Apêndice VIII – Rotina computacional elaborada para análise gráfica e regressão não linear sigmoideal do presente trabalho, com a finalidade de comparar simultaneamente as curvas de 48 replicatas, integrantes da mesma condição experimental e cDNA alvo, visando identificar as curvas tipo 2 ou tipo 1 (se houver) representativas do conjunto, que ofereçam as melhores condições para realização da regressão não linear sigmoideal. Os resultados obtidos para

cada uma das condições experimentais e cDNA alvos, são apresentados no apêndice IX – Eficiências de amplificação, do presente trabalho.

4.5.6 Metodologia de cálculo para quantificação relativa e a redução dos erros associados

Em decorrência de terem sido utilizados no presente trabalho valores de *threshold* distintos para cada gene e condição experimental (interprete-se situação questionada e situação calibradora), para fins de determinação do nível de expressão gênica relativa, faz-se necessária a utilização da Expressão 24 deduzida no capítulo 3.8.7 do presente trabalho, a qual pressupõe para sua utilização o cálculo prévio de cada um dos 4 fatores que a compõem, incluindo os fatores de normalização. Os valores inicialmente obtidos são apresentados no Apêndice X – Fatores amostrais e fatores de normalização e após a realização da normalização no Apêndice XI – Fatores amostrais normalizados. Não foi realizado experimento secundário envolvendo o uso de diferentes expressões.

4.5.7 Teoria de propagação de erros e a determinação correta do erro experimental

Mediante a realização do experimento descrito no cap. 3.8.9, foram obtidos os valores de erro e razões erro/média apresentados respectivamente nas Tabelas 33 e 34.

Tabela 33 – Valores obtidos para cada metodologia de cálculo do erro. Fonte: O autor

Erro	<i>prfA</i>	<i>sigB</i>	<i>ctsR</i>	<i>lexA</i>	<i>dnaA</i>	<i>virR</i>	<i>kat</i>	1433	<i>rpoD</i>	<i>rpsL</i>	<i>infA</i>
populacional propagado	0,159	2,085	2,114	0,314	1,871	0,081	0,064	0,041	0,065	0,050	0,730
populacional não propagado	0,067	1,445	1,523	0,060	0,683	0,010	0,082	0,047	0,040	0,074	0,564
amostral propagado	0,437	5,108	5,990	0,889	4,590	0,187	0,181	0,119	0,185	0,148	2,162
amostral não propagado	0,191	3,539	4,306	0,170	1,672	0,023	0,233	0,141	0,112	0,223	1,692

Tabela 34 – Razões entre os erros obtidos e suas respectivas médias populacionais. Fonte: O autor

Erro	<i>prfA</i>	<i>sigB</i>	<i>ctsR</i>	<i>lexA</i>	<i>dnaA</i>	<i>virR</i>	<i>kat</i>	1433	<i>rpoD</i>	<i>rpsL</i>	<i>infA</i>
populacional propagado	15,5%	40,7%	36,7%	20,5%	44,3%	13,7%	7,4%	5,1%	6,1%	5,4%	27,0%
populacional não propagado	6,6%	28,2%	26,4%	3,9%	16,2%	1,6%	9,5%	5,8%	3,7%	8,1%	20,9%
amostral propagado	42,4%	99,8%	104,0%	58,0%	108,7%	31,6%	20,8%	14,7%	17,3%	16,0%	80,0%
amostral não propagado	18,5%	69,2%	74,7%	11,1%	39,6%	3,9%	26,9%	17,4%	10,5%	24,2%	62,6%

4.6 Avaliação da expressão de genes associados à resistência à nisina

Nesta seção serão apresentados os resultados das análises principais do trabalho. Faz-se necessário ressaltar que ao longo do desenvolvimento do trabalho vêm sendo adotadas todas as recomendações realizadas, as quais estão a seguir compiladas, a fim de assegurar a obtenção de resultados consistentes no PCR quantitativo:

- Emprego da metodologia DNF-RT-qPCR através da utilização de primers tagueados, evitando-se a amplificação do gDNA e a degradação do mRNA;
- Posicionamento criterioso da linha de *threshold*, evitando-se a extração de valores de Ct fora da fase log-linear das curvas de amplificação, assim como possibilitando o aumento da convergência dos valores de Ct entre as respectivas replicatas técnicas;
- Utilização das curvas de melting para detecção e exclusão de replicatas técnicas onde tenha ocorrido a formação de produtos de amplificação indesejados;
- Determinação do gene normalizador ou fator de normalização, de forma criteriosa, baseando-se no resultado dos três principais algoritmos de normalização disponíveis;
- Determinação da eficiência de amplificação baseando-se nos dados da própria reação de PCR e se possível com valores individualizados para cada replicata;
- Seleção da expressão para determinação do nível de expressão gênica relativa, adequada ao perfil de variação dos valores de threshold e eficiências de amplificação entre as amostras;
- Utilização de um número de replicatas totais adequado à obtenção de relevância estatística onde de fato esta existir;
- Determinação do erro associado às médias populacionais, considerando a extrapolação do erro amostral para a população, assim como a propagação deste através das manipulações matemáticas realizadas subsequentemente, não tornando resultados incorretamente conclusivos ou inconclusivos.

4.6.1 Estudo temporal da resposta

Esta primeira análise tem como objetivo possibilitar uma melhor compreensão sobre como transcorre a resposta ao longo do tempo de *L. monocytogenes* à presença de nisina no meio. Para isso, foram utilizados na determinação do nível de expressão gênica apenas os dados da condição experimental nisina livre na concentração de 100 mg/L, considerando como situação calibradora as leituras 5 min após a adição e como situação questionada as demais leituras. Os resultados são apresentados no Apêndice XII – Níveis de expressão gênica – estudo temporal da resposta. Verificou-se através da aplicação de um teste t-student com nível de significância de 5%, que somente através da combinação das replicatas biológicas 1 e 3 foi possível a extrapolação dos resultados amostrais obtidos para a população, com uma probabilidade de ocorrência igual ou maior a 95%. Uma vez que tanto os dados da situação questionada como calibradora pertencem às mesmas replicatas biológicas, as médias amostrais e populacionais foram determinadas somente após o cálculo do nível de expressão gênica relativa. As médias e erros populacionais obtidos para o nível de expressão gênica relativa são disponibilizadas no Apêndice XIII – Médias e erros populacionais – estudo temporal da resposta e a respectiva visualização gráfica dos resultados é apresentada nas Figuras 73, 74, 75 e 76.

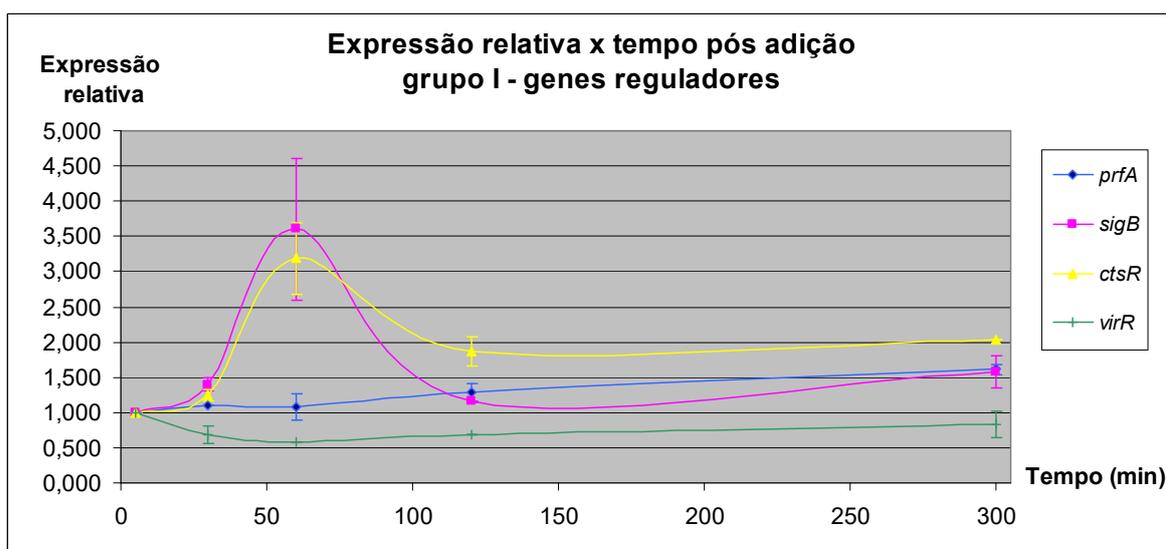


Figura 73 – Níveis de expressão gênica relativa ao longo do tempo – nisina livre 100 mg/L – genes reguladores. Fonte: O autor

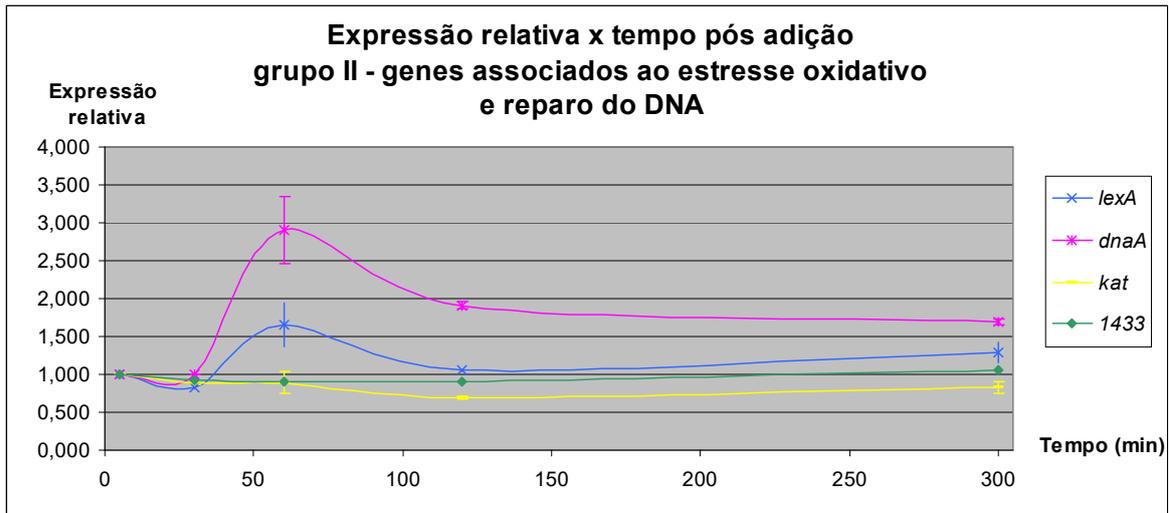


Figura 74 – Níveis de expressão gênica relativa ao longo do tempo – nisina livre 100 mg/L – genes associados ao estresse oxidativo e reparo de DNA. Fonte: O autor

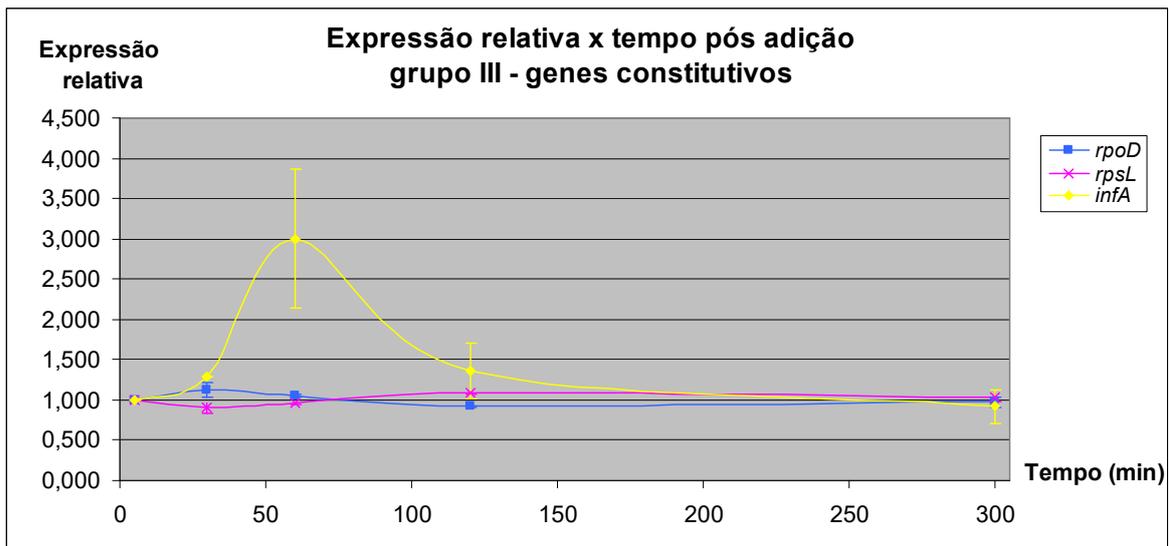


Figura 75 – Níveis de expressão gênica relativa ao longo do tempo – nisina livre 100 mg/L – genes constitutivos. Fonte: O autor

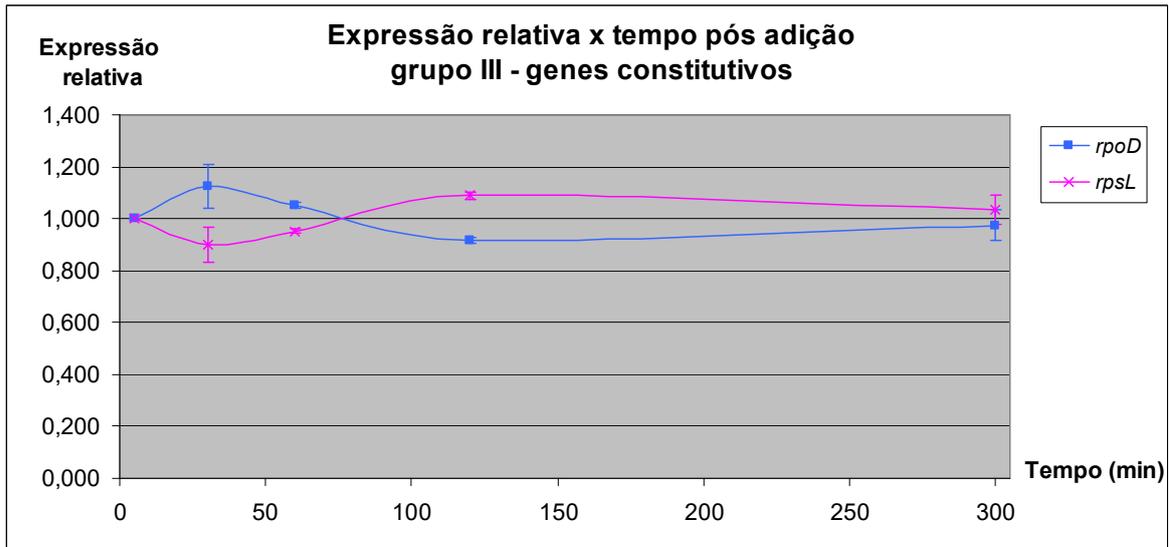


Figura 76 – Níveis de expressão gênica relativa ao longo do tempo – nisina livre 100 mg/L – genes normalizadores. Fonte: O autor

Tendo em vista que os resultados demonstraram para a maioria dos genes que o pico na resposta à nisina (seja ele *up-regulated* ou *down-regulated*) ocorre 60 min após a adição do peptídeo, procurou-se realizar as demais análises a serem apresentadas neste mesmo *time-point*.

4.6.2 Estudo dose dependente

A segunda análise tem por objetivo principal avaliar possíveis efeitos da concentração de nisina sobre a resposta de *L. monocytogenes* (efeitos dose-dependentes). Para isso, foram utilizados na determinação do nível de expressão gênica os dados das condições experimentais nisina livre na concentração de 100 mg/L, como situação questionada e nisina livre na concentração de 1 mg/L, como situação calibradora. Uma vez que nesta análise os dados da situação questionada e calibradora pertencem a replicatas biológicas distintas, as médias amostrais foram determinadas previamente ao cálculo do nível de expressão gênica relativa. Os resultados são apresentados no Apêndice XIV – Média dos fatores amostrais normalizados.

Verificou-se através da aplicação de um teste t-student com nível de significância de 5%, combinando as replicatas biológicas duas a duas, que a

média amostral das 3 replicatas permite demonstrar na população uma variação da resposta de *L. monocytogenes* a diferentes concentrações de nisina livre, para os genes *sigB*, *ctsR*, *virR*, *kat*, *lmo1433* e *infA*, com uma probabilidade de ocorrência igual ou maior a 95%. As médias e erros populacionais obtidos para o nível de expressão gênica relativa são disponibilizadas no Apêndice XV – Médias e erros populacionais – estudo dose dependente e a respectiva visualização gráfica dos resultados é apresentada na Figura 77.

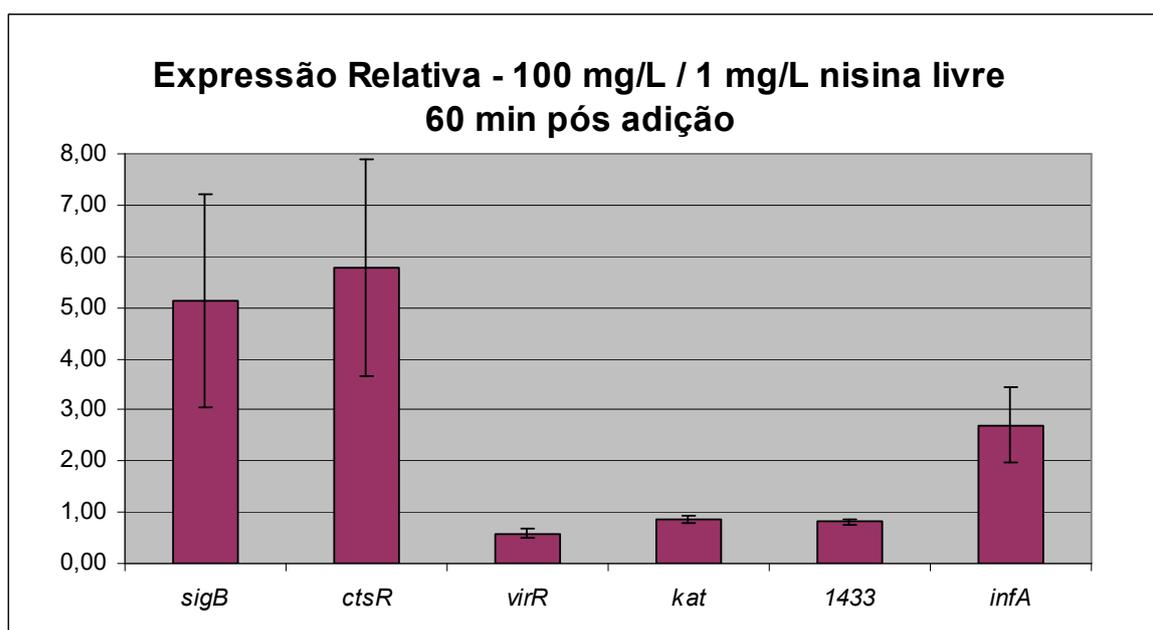


Figura 77 – Níveis de expressão gênica relativa – nisina livre 100 mg/L comparativamente à nisina livre 1 mg/L, no *time-point* 60 min pós adição. Fonte: O autor

4.6.3 Expressão gênica diferencial

A terceira análise tem o objetivo de identificar a expressão gênica diferencial de *L. monocytogenes* à nisina nanoencapsulada em lipossomos. Para isso, foram utilizados na determinação do nível de expressão gênica os dados das condições experimentais nisina nanoencapsulada e lipossomo branco, como situações questionadas e nisina livre na concentração de 100 mg/L, como situação calibradora. Uma vez que os dados das situações questionadas e calibradora pertencem a replicatas biológicas distintas, mais uma vez as médias amostrais foram determinadas previamente ao cálculo do nível de expressão

gênica relativa. Os resultados são apresentados no Apêndice XIV – Média dos fatores amostrais normalizados. As médias e erros populacionais obtidos para o nível de expressão gênica relativa são disponibilizados no Apêndice XVI – Médias e erros populacionais – expressão gênica diferencial.

Verificou-se através da aplicação de um teste t-student com nível de significância de 5%, combinando as replicatas biológicas duas a duas, que a média amostral das 3 replicatas permite demonstrar na população com uma probabilidade de ocorrência igual ou maior a 95% uma expressão diferencial dos genes *prfA*, *ctsR*, *dnaA*, *virR*, *kat*, *lmo1433*, *rpoD* e *infA* na condição experimental nisina nanoencapsulada, comparativamente à nisina livre na concentração 100 mg/L. De maneira análoga, foi também demonstrada a expressão diferencial dos genes *prfA*, *ctsR*, *lexA*, *virR*, *kat*, *lmo1433* e *infA* na condição experimental lipossomo branco, comparativamente à nisina livre na concentração 100 mg/L. Os resultados obtidos são apresentados graficamente nas Figuras 78 e 79.

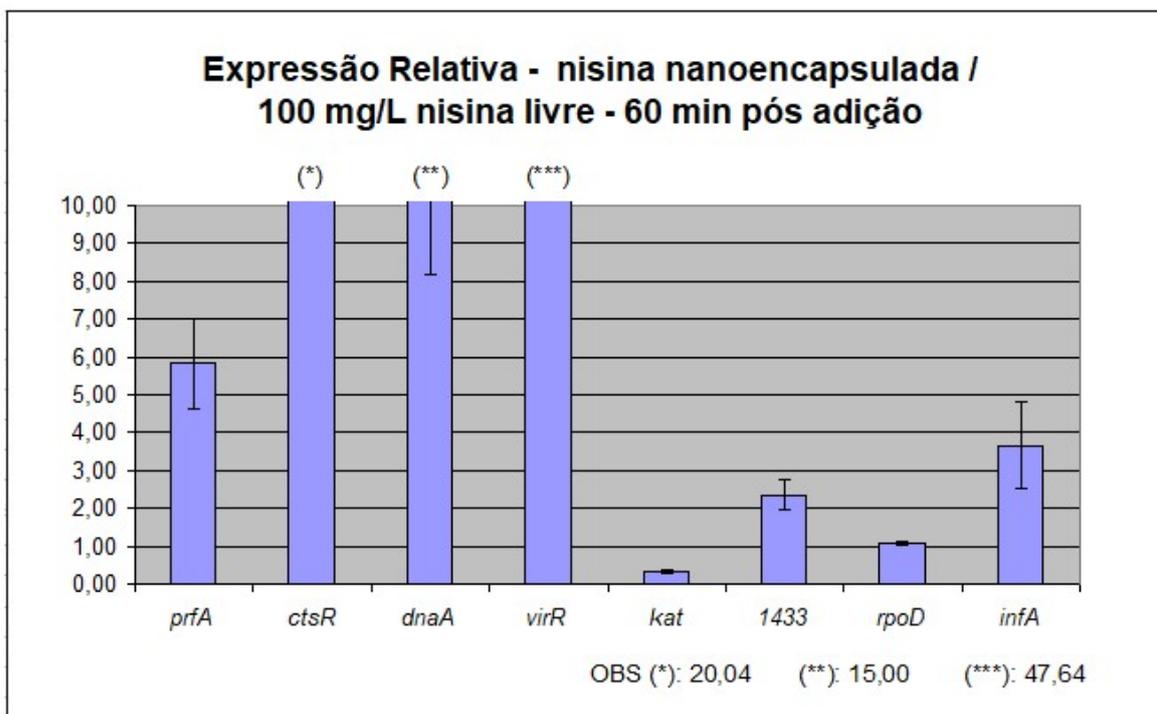


Figura 78 – Níveis de expressão gênica relativa – nisina nanoencapsulada comparativamente à nisina livre 100 mg/L, no *time-point* 60 min pós adição. Fonte: O autor

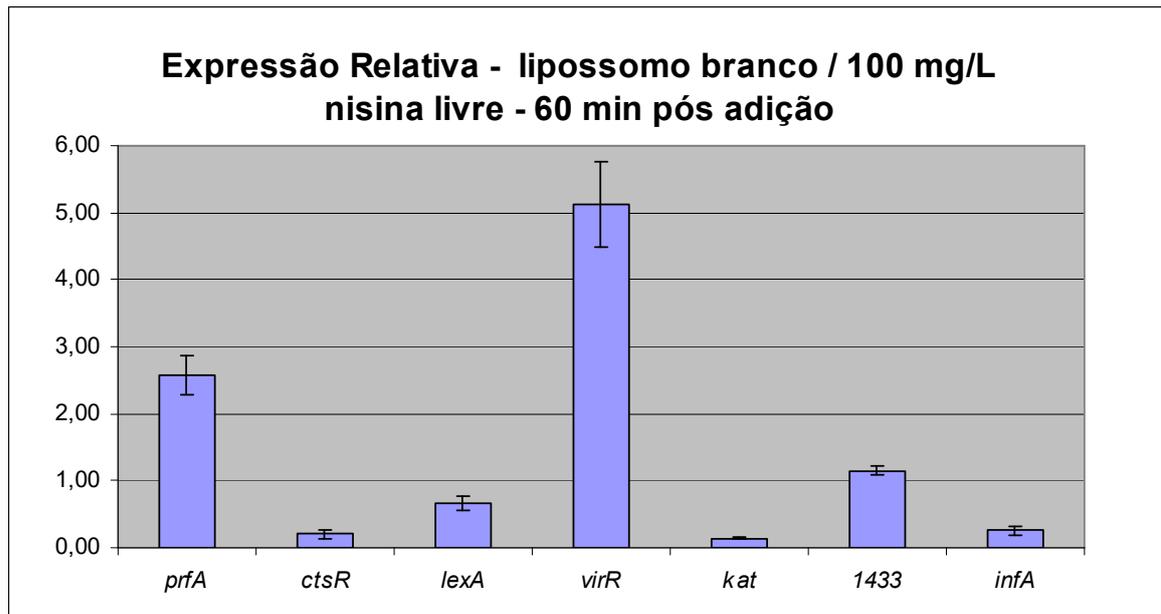


Figura 79 – Níveis de expressão gênica relativa – lipossomo branco comparativamente à nisina livre 100 mg/L, no *time-point* 60 min pós adição. Fonte: O autor

Tendo por objetivo uma melhor elucidação da expressão gênica diferencial à nisina nanoencapsulada, em particular, quais seriam as alterações na resposta de *L. monocytogenes* exclusivamente decorrentes do conteúdo do lipossomo, foi ainda realizada uma análise complementar, constituída pela determinação do nível de expressão gênica relativa entre as condições experimentais lipossomo branco, como situação questionada e nisina livre na concentração 1 mg/L, como situação calibradora. As médias amostrais já haviam sido apresentadas no Apêndice XIV – Média dos fatores amostrais normalizados.

As médias e erros populacionais obtidos para o nível de expressão gênica relativa são disponibilizados no Apêndice XVII – Médias e erros populacionais – análise complementar. Foi demonstrado pelo teste t-student uma expressão diferencial estatisticamente significativa na população, para os genes *prfA*, *dnaA*, *virR*, *kat* e *infA*. Os resultados obtidos são apresentados graficamente na Figura 80.

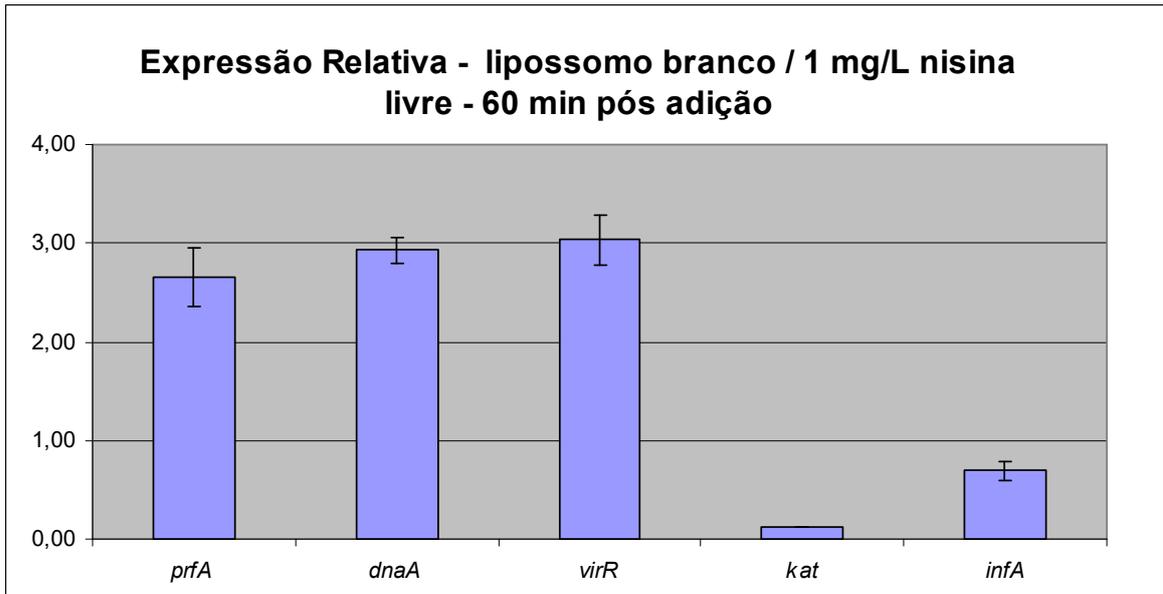


Figura 80 – Níveis de expressão gênica relativa – lipossomo branco comparativamente à nisina livre 1 mg/L, no *time-point* 60 min pós adição. Fonte: O autor

5. Discussão

5.1 Caracterização dos lipossomos

A) Diâmetro e índice de polidispersão:

Verifica-se dentre as leituras apresentadas na Tabela 17, que alguns resultados excedem o diâmetro definido no cap. 3.3. Salieta-se porém, que os lipossomos em questão destinam-se à aplicação na conservação de alimentos, não havendo portanto, obrigatoriedade para que cumpram sua função, do atendimento exato do valor definido. Desta forma, a caracterização do diâmetro predominante e índice de polidispersão no presente trabalho têm por principais objetivos assegurar a reprodutibilidade do experimento, além de possibilitar um melhor pareamento entre as replicatas biológicas das diferentes condições experimentais. Mesmo assim, quanto ao diâmetro predominante, observa-se dos valores apresentados no cap. 4.2, que somente três lotes (BP_01, BP_04 e NI_03) se distanciaram do valor de 100 nm, havendo inclusive um lote (NI_01) com diâmetro predominante abaixo deste valor. Estes resultados sugerem que a redução e uniformização do diâmetro das partículas através dos ciclos homogeneizadores e ciclos de redução de tamanho foram bem sucedidas.

B) Potencial zeta:

Observa-se da Tabela 19, que as leituras de potencial Zeta obtidas estão fora da faixa recomendada no cap. 3.3 para estabilização da suspensão coloidal ao longo do tempo exclusivamente através da sua carga elétrica (igual ou superior a 30 mV em módulo). Porém, tal fato não constituiu impedimento para a utilização dos lipossomos no presente trabalho, tendo em vista que os mesmos foram aplicados imediatamente após a caracterização, não havendo portanto, prejuízo à estabilidade da suspensão. Além disso, durante a realização do experimento a solução de lipossomos foi diluída no meio de cultura e permaneceu em shaker orbital, fatos que também contribuem para redução da formação de agregados.

A obtenção destes valores provavelmente está relacionada à matéria prima empregada para o preparo dos lipossomos, sendo menos dependente da forma de preparo. De fato, conforme demonstrado por TAYLOR et al. (2007), ao

sintetizar lipossomos sem adição de nisina, a 25 °C, empregando somente fosfatidilcolina pura, resultou potencial Zeta de -8,3 mV, valor totalmente compatível com os obtidos no presente experimento para os lipossomos brancos. Já utilizando uma mistura de 80%-20% de fosfatidilcolina/fosfatidilglicerol foi obtido potencial Zeta de -52,3 mV e ainda utilizando uma proporção de 60%-40% o potencial Zeta foi de -72,6 mV.

Outro aspecto que pode ser observado é a nítida diferença entre os potenciais Zeta obtidos para os lipossomos brancos e para os lipossomos de nisina. Como já descrito anteriormente as moléculas de nisina possuem caráter catiônico, assim, tendo sido utilizada uma solução com concentração relativamente alta de nisina (2,5 mg/mL), decorre a incorporação de grande quantidade de moléculas catiônicas ao lipossomo, fato que resultou na inversão de carga do potencial Zeta de todas as amostras, corroborando com as eficiências de encapsulação obtidas.

C) Eficiência de encapsulação:

Uma vez que parte do objetivo principal do trabalho consiste na avaliação da expressão gênica diferencial entre as condições de nisina livre e nisina nanoencapsulada em lipossomos, faz-se necessária irrevogavelmente a obtenção de uma eficiência de encapsulação de 100% em todos os lotes de lipossomos utilizados, objetivo que foi alcançado conforme descrito no capítulo 4.2.

5.2 Avaliação do perfil inibitório

Conforme demonstrado no trabalho de TAKHISTOV et al. (2009), observa-se efeito bactericida (letal) em cultivos de *L. monocytogenes* em meio BHI, para concentrações de nisina livre iguais ou superiores a 2×10^3 IU/mL. Segundo GHARSALLAOUI et al. (2016), 1 Unidade Internacional corresponde à quantidade de nisina necessária para inibir uma célula de *Streptococcus agalactiae* em 1 mL de meio de cultivo líquido, cujo valor é de $2,5 \times 10^{-8}$ g. Desta forma, o trabalho de TAKHISTOV et al. (2009), aponta a ocorrência de efeito bactericida em condições experimentais semelhantes às utilizadas no presente estudo para concentrações

de nisina livre a partir de 50 mg/L, corroborando assim com os resultados apresentados na Figura 50 (efeito bactericida na concentração de 100 mg/L e ausência de efeito bactericida nas concentrações iguais ou menores à 10 mg/L).

Por sua vez, o comportamento apresentado no gráfico da Figura 54, sugere que após a adição dos lipossomos, realizada às 8,95 h, o cultivo continua se comportando de forma muito similar a um cultivo sem adição de nisina. Porém, transcorridas cerca de 2 h após a adição, é possível observar um leve descolamento das curvas de crescimento para cima, comparativamente ao cultivo sem nisina, seguido de uma taxa de crescimento bastante acentuada, o que sugere a constituição de uma nova fase log. Este achado levanta a suspeita de que a fosfatidilcolina, constituinte comum à formulação de ambos os tipos de lipossomos, esteja sendo utilizada como substrato no metabolismo de *L. monocytogenes*, configurando desta forma a adição dos mesmos, um enriquecimento do meio de cultivo, uma vez que do contrário o limite superior para a curva de crescimento destas condições experimentais seria a curva de crescimento sem nisina.

Diante de tais resultados, é admissível questionar se a liberação da nisina realmente esteja ocorrendo nas condições do experimento. Essa verificação foi realizada em trabalho anterior, tendo sido demonstrado por DA SILVA et al. (2014), que transcorridas 2h após a adição da nisina nanoencapsulada em lipossomos de fosfatidilcolina, em meio de cultivo BHI com *L. monocytogenes*, verifica-se a liberação de cerca de 25% da quantidade de nisina nanoencapsulada.

5.3 Experimentos secundários envolvendo as principais variáveis do qPCR

5.3.1 Uso de primers tagueados e a eliminação da degradação de mRNA e da contaminação com DNA genômico

A redução de cerca de 14% na concentração de RNA total após o tratamento com DNase I, demonstrada na Tabela 23, está em consonância qualitativa com resultados já apontados no trabalho de GADKAR & FILION

(2013), o qual obtiveram em suas condições experimentais mais de 47% de perda de RNA em apenas uma única rodada de tratamento com DNase I.

Um questionamento inevitável consiste em pensar se no caso de uma quantificação relativa da expressão gênica (ao invés de uma quantificação absoluta), submetendo a amostra ao tratamento com DNase I, resultando assim algum nível de perda na quantidade de RNA total, isso afetaria o resultado da reação de PCR, já que tanto o gene de interesse, quanto o gene normalizador estariam sendo submetidos às mesmas perdas. Ocorre porém, que não há nenhum motivo especial para supor que submetendo o RNA total a um mesmo agente estressor, diferentes mRNAs, com diferentes comprimentos, diferentes níveis de G-C e diferentes tendências de autodobramento, as taxas de degradação serão idênticas para todos eles. De fato, observando os valores de Ct apresentados na Tabela 24 e na Figura 55, é possível abstrair com facilidade duas conclusões. A primeira delas é que para 12 dos 13 genes analisados, a metodologia de transcrição reversa utilizando primers convencionais, tratados com DNase I portanto, apresentou valores de Ct mais altos que os obtidos através da metodologia de transcrição reversa DNaseFree, utilizando primers tagueados, demonstrando assim a ocorrência de perdas na execução da metodologia com primers convencionais, resultado que está em perfeito alinhamento com o trabalho de GADKAR & FILION (2013). A segunda conclusão é que tomando os valores de Ct obtidos para cada gene através da metodologia DNaseFree como referência, foram obtidos através da metodologia convencional, valores de Ct variando de 0 a 26% maiores, conforme o gene, comprovando assim, que a taxa de dano ao mRNA é variável conforme o mRNA, aspecto que portanto, afetará o resultado da reação de PCR.

De fato, conforme se conclui da observação dos resultados do qPCR nas Figuras 56, 57 e 58, para as amostras 21X5, 22X5 e 23X5 respectivamente, comparando o uso da metodologia com primers tagueados (situação calibradora) e primers convencionais (situação questionada), com exceção do gene *virR*, o qual constitui o gene adotado como normalizador, foi encontrado para todos os demais genes níveis de expressão distintos da situação calibradora, compreendidos desde uma redução de 91% como no caso do gene *infA* na

amostra 22X5 até um aumento de 2.697% como no caso do gene *ctsR* na amostra 21X5.

Assim, fica demonstrado através dos resultados apresentados, a importância da utilização de primers tagueados em substituição ao uso de primers convencionais associados ao tratamento com DNase I, para assegurar que os resultados do qPCR sejam os mais fidedignos possíveis, assim como o potencial impacto que a utilização da metodologia convencional teria sobre os resultados do presente trabalho. Vale salientar mais uma vez, que com exceção do experimento secundário descrito no cap. 3.8.2, todo o restante do presente trabalho foi realizado exclusivamente com a utilização de primers tagueados, sem necessidade de tratamento com DNase I portanto.

5.3.2 Definição da *thresholdline* e a redução dos erros associados

A principal conclusão demonstrada através dos resultados apresentados no cap. 4.5.2 é que embora o valor de *threshold* constitua um valor de ΔRn arbitrariamente definido, desde que este tenha sido definido no local correto, ou seja simultaneamente dentro da fase log-linear das curvas de amplificação de todas as amostras em análise, mesmo que arbitrando-se valores maiores de *threshold*, correspondam valores maiores de Ct , os valores de ΔCt permanecerão inalterados, demonstrando assim que se corretamente posicionada a linha de *threshold* sobre as fases log-linear, a arbitrariedade inerente a sua definição não implica em nenhuma interferência sobre os resultados do qPCR.

Esta conclusão pode ser evidenciada a título de exemplo através dos resultados obtidos para o gene *sod* na amostra 22X3, os quais são apresentados na Figura 59. Conforme se observa, arbitrando-se como valores de *threshold* 4.000, 6.000, 8.000 e 12.000, resultam respectivamente valores de Ct iguais a 20.79, 21.46, 21.95 e 22.66. Porém, uma vez que todos estes valores de *threshold* situam-se na fase log-linear da curva de amplificação das 3 replicatas técnicas, após normalização obtêm-se o mesmo valor de ΔCt , independente do valor de *threshold* inicialmente arbitrado.

De maneira adversa, arbitrando-se valores de *threshold* situados fora da fase log-linear, mesmo que apenas para uma única replicata, o resultado final do qPCR será impactado, passando a incorporar um erro. A título de exemplo, esta situação pode ser evidenciada através dos resultados obtidos para o gene *recA* na amostra 22X3, apresentados na Figura 60. Para valores de *threshold* arbitrados entre os pontos A e B (2.000, 4.000 e 6.000), os valores de ΔCt permanecem constantes, porém, para valores de *threshold* situados entre B e C (8.000) ou acima de C (12.000), ocorre a incorporação de erro no valor de ΔCt (até 43%) em razão da mudança na primeira derivada das curvas. Impacto semelhante pode ser observado para o gene *sod* na amostra 21X3, apresentado através da Figura 61, onde para valores de *threshold* definidos abaixo do ponto de inflexão A (2.000) ou entre os pontos de inflexão B e C (6.000, 8.000 e 12.000), ocorre a incorporação de erro no valor de ΔCt (até 40%).

Embora os erros encontrados nos valores de Ct tenham se limitado até um máximo de 43% do valor correto, os resultados do qPCR apresentados na Tabela 25 evidenciaram a propagação deste erro resultando nas situações questionadas valores até 92% menores e até 84% maiores que os da situação calibradora.

Desta forma, fica demonstrado através de todos resultados apresentados, a importância da escolha da *thresholdline* para assegurar que os resultados do qPCR sejam os mais fidedignos possíveis, assim como o potencial impacto que uma escolha arbitrada sem critérios, teria sobre os resultados do presente trabalho. Para evitar que isso ocorresse, o posicionamento da linha de *threshold* em cada conjunto de amostras, foi analisada de forma criteriosa, previamente à extração dos respectivos valores de Ct.

Conforme se observa na Figura 62, no valor de *threshold* definido automaticamente pelo software, ainda é possível constatar a presença de ruído na leitura da fluorescência, assim como a falta de paralelismo entre as curvas de amplificação, aspectos que são minimizados com o novo valor de *threshold*. A melhora típica foi demonstrada através da Figura 63, na qual após reposicionamento da linha de *threshold* para um valor mais adequado observa-se para um conjunto de replicatas técnicas a redução do desvio padrão entre os valores de Ct, aumentando assim a exatidão da média calculada.

Como última discussão a ser realizada no presente capítulo, conforme apresentado na Tabela 26, foram automaticamente definidos pelo software do termociclador para o gene *16S rRNA*, valores de *threshold* iguais a 20.074 e 21.992, respectivamente para as condições experimentais nisina livre e lipossomo branco/nisina, os quais notadamente encontram-se muito acima de todos os demais valores de *threshold* adotados (156,74% acima do segundo maior valor). Observação semelhante já havia sido realizada no cap. 4.5.1, uma vez que o gene *16S rRNA (Imor04)* havia sido excluído da análise em razão do valor de *threshold* a ser adotado para ele, não ser compatível com o adotado para todos os demais genes. Tal fato decorre da alta similaridade do gene *Imor04* (96 a 99%), com outros 5 genes (*Imor1*, *Imor9*, *Imor12*, *Imor15* e *Imor18*), os quais também codificam a síntese de *RNA ribossomal*, dificultando extremamente a obtenção de primers com os parâmetros de projeto utilizados, que não reconheçam as outras sequências. Outro inconveniente gerado é que mesmo com a adoção de valores elevados de *threshold*, resultaram valores de Ct (não apresentados) muito baixos (a partir de 6.48), prejudicando assim o cálculo fidedigno da eficiência de amplificação, em razão da saturação precoce da curva de amplificação. Importante salientar que mesmo que fosse realizada uma otimização da reação de PCR (atividade não prevista no escopo do trabalho), adotando-se por exemplo maior diluição das amostras para as reações relativas ao gene *16S rRNA*, ainda assim a utilização deste como gene de referência torna-se passível de questionamento, uma vez que consolida a expressão de um total de seis genes, todos co-regulados, razões pelas quais o gene *16S rRNA* foi excluído do presente estudo.

5.3.3 Curvas de *melting* e a detecção de produtos de amplificação indesejados

Conforme se observa da Tabela 28, com exceção dos genes *sigB*, *recA* e *sod*, para todos os demais foram obtidos percentuais elevados (de 82,80% a 98,92%) de curvas de *melting* ideais ou muito próximas de ideais (tipo 1), demonstrando assim o funcionamento adequado dos primers projetados. Os

percentuais obtidos estão alinhados à expectativa, tendo-se em vista que não foi realizado no presente estudo otimização da reação de amplificação para cada uma das condições amostrais e conjunto de primers utilizados, conforme já descrito no cap. 3.8.1. Ademais, considerando-se a quantidade de replicatas biológicas e técnicas utilizadas, a exclusão de resultados amostrais associados às curvas de *melting* fora do padrão ideal, não inviabilizaram o prosseguimento das análises.

Já para os genes *sigB*, *recA* e *sod*, foram obtidos percentuais insatisfatórios de curvas de *melting* ideais (respectivamente 62,90%, 29,03% e 60,22%), indicando conforme já descrito no Apêndice II - Ferramentas para detecção e prevenção de produtos de amplificação indesejados, a necessidade de aumento da temperatura de anelamento, a redução da concentração de primers, a redução da concentração de Mg^{2+} ou o reprojeto do conjunto de primers. Uma vez que, não se dispunha de tempo hábil para o reprojeto e fornecimento de primers, nem mesmo para retorno às atividades experimentais, a expressão dos genes *recA* e *sod* não pode ser analisada no presente trabalho, assim como pelo mesmo motivo a expressão do gene *sigB* ficou restrita às análises envolvendo as condições experimentais nisina livre nas concentrações 100 mg/L e 1 mg/L. Por esta razão, não constam médias dos valores de Ct entre replicatas técnicas, para os genes *recA* e *sod*, na Tabela apresentada no Apêndice VII – Médias dos valores de Ct entre replicatas técnicas.

Conforme se observa na Tabela 29, para os primers *forward* e *reverse* all do gene *sod*, foram obtidos tanto para a formação de dímeros de primers como para a formação de autodobramentos, escores iguais a 1. Acrescentando na análise o primer *reverse* tagueado, utilizado na etapa de transcrição reversa e portanto, incorporado à reação de PCR através da amostra, foram obtidos scores 2 e 3, respectivamente.

De forma análoga, para o gene *sigB*, após a inclusão do primer *reverse* tagueado na análise, os scores associados à formação de dímeros de primers e autodobramentos aumentaram respectivamente de 3 e 1 para 3 e 2.

Por fim, embora o dímero formado entre o primer *forward* e o primer *reverse* tagueado do gene *recA*, após sua inclusão na análise, contemple um total

de 14 matches, isto resultou num score de apenas 5, com estabilidade do dímero até 15,2 °C. Da mesma forma, o autodobramento do primer *reverse* tagueado resultou num score de apenas 4, com estabilidade do grampo até 29,5 °C conforme demonstrado através da Figura 66.

Conforme descrito no Apêndice II - Ferramentas para detecção e prevenção de produtos de amplificação indesejados, dificilmente são encontrados problemas com formação de dímeros de primers ou autodobramentos, nas temperaturas da reação, em scores abaixo de 7 ou 8, tampouco com temperaturas de dissociação inferiores à temperatura de anelamento, uma vez que nas temperaturas da reação já estarão dissociados. Desta forma, o programa AUTODIMER não demonstrou capacidade de prever o mau funcionamento dos primers analisados, o que sugere a hipótese que para os genes em questão, a concentração de mRNA na amostra seja muito baixa e/ou a concentração de primers esteja muito elevada.

5.3.4 Genes normalizadores

Conforme se conclui a partir da observação da Tabela 30, a ordenação obtida para os genes quanto a sua estabilidade não foi perfeitamente idêntica entre os diferentes algoritmos normalizadores, fato que já era esperado, embora tenham sido identificadas algumas semelhanças. Como semelhança mais importante, pode-se destacar que dois dos três algoritmos (NormFinder e GeNorm) apontaram os genes *rpsL* e *rpoD* como sendo os 2 genes mais estáveis dentre todo o conjunto dos genes testados. Embora no Apêndice III - Análise dos principais algoritmos para normalização, tenha sido demonstrada uma melhor compreensão e clareza do algoritmo GeNorm, atribuindo-lhe portanto, maior confiabilidade, ressalta-se a importância da confirmação simultânea dos resultados em mais de um algoritmo para uma maior acurácia na identificação do normalizador. Ainda conforme descrito no mesmo apêndice, foram apontados alguns aspectos do algoritmo BestKeeper, os quais possivelmente resultariam em divergência de resultados em relação aos demais algoritmos.

Também foi demonstrado pelo algoritmo GeNorm (Figura 67) que a combinação dos genes *rpsL* e *rpoD* apresentava maior estabilidade que o gene *rpoD* isoladamente (0.022 contra 0.037) e que não haveria qualquer aumento de estabilidade ao ampliarmos a combinação de dois para três genes. Ressalta-se inclusive, que o valor de estabilidade obtido está cerca de 70 vezes abaixo da máxima estabilidade aceitável (1,500) e cerca de 7 vezes abaixo da máxima estabilidade ideal (0,150) para um gene de referência no algoritmo GeNorm, balizando desta forma os valores obtidos.

Outro aspecto a destacar é que conforme descrito no cap. 3.6, os genes *rpsL* e *rpoD* já haviam sido selecionados na literatura científica, juntamente com o gene *infA*, como candidatos à gene de referência em substituição aos possíveis problemas associados ao uso do gene *16S rRNA*, fato que se confirmou ao demonstrarem estabilidade superior a todos os demais genes, inclusive *infA*. A complementaridade entre o comportamento dos genes *rpsL* e *rpoD* para compor um bom fator de normalização, assim como a menor estabilidade de *infA* ao longo do tempo, também foram evidenciadas através das Figuras 75 e 76.

Para realizar a combinação dos valores de Ct de dois ou mais genes, muitos pesquisadores utilizam a média geométrica, baseando-se na justificativa que caso o valor de Ct de um dos genes aumente de forma súbita em alguma amostra, afastando-se do comportamento esperado, a média geométrica será menos influenciada que a média aritmética, afirmação esta que está correta. Porém, é necessário lembrar, que muitas vezes são apontados pelos algoritmos genes com comportamentos divergentes ou até mesmo com comportamentos opostos, os quais uma vez combinados, fornecem a melhor aproximação possível do normalizador ideal. Nestes casos, o uso da média geométrica induziria clara distorção, ao forçar artificialmente o resultado da média a manter-se sempre próximo do menor valor utilizado em seu cálculo. Outro aspecto a considerar, é que no caso de necessidade de determinação do nível de expressão gênica relativa através da Expressão 24, faz-se necessária a determinação tanto de um valor de Ct, como de um valor de *threshold* representativos do fator de normalização. Pensando nas curvas de amplificação como funções bidimensionais, cada ponto P sobre as curvas fica definido através de um par

ordenado $P(Ct, threshold)$. Desta forma, dados 2 pontos quaisquer de 2 curvas distintas da mesma família de funções, a interpolação de um ponto médio entre aqueles pode ser facilmente obtida através da média aritmética entre as coordenadas do eixo x (Ct) e a média aritmética entre as coordenadas do eixo y (*threshold*) dos genes apontados.

Assim, para fins do presente estudo, foi adotado como fator de normalização, a média aritmética entre os valores de Ct obtidos para os genes *rpoD* e *rpsL* e como valor de *threshold* do fator de normalização, a média aritmética entre os valores de *threshold* definidos para os mesmos genes.

Por fim, demonstrou-se que a escolha incorreta de normalizadores, teria resultado em valores variando de 84,8% a 108,5% do valor correto para o fator de normalização, ressaltando assim a relevância da escolha do normalizador, para uma correta quantificação do qPCR.

5.3.5 Determinação da eficiência de amplificação e a redução dos erros associados

Fica assim demonstrado a partir dos resultados apresentados na Tabela 32, que as expressões dos trabalhos de GENTLE et al. (2001), LIU & SAINT (2002) e PEIRSON et al. (2003), apresentam erros incorporados às mesmas, inviabilizando a sua utilização para determinação da eficiência de amplificação. Foi também demonstrada a validade das Expressões 6, 7 e 16, deduzidas no cap. 3.8.6 do presente trabalho. Em razão da sua maior simplicidade de cálculo, a Expressão 7 foi a escolhida para utilização neste trabalho.

Oportuno ressaltar que as Expressões 6 e 16, deduzidas no presente estudo, constituem respectivamente a forma correta das expressões propostas nos trabalhos de LIU & SAINT (2002) e PEIRSON et al. (2003).

Para superação das diversas dificuldades encontradas para determinação das eficiências a partir dos dados provenientes da própria reação de amplificação, foi necessário a proposição de uma metodologia, composta além da dedução da Expressão 7, para determinação das eficiências de amplificação entre dois ciclos subsequentes, do estabelecimento de uma classificação para as curvas de

eficiência (Figura 70), da modelagem da curva de eficiência através de uma família de funções sigmoidais (Expressão 34) e da elaboração de um código em VBA para realização de forma simultânea da análise gráfica de todas as replicatas de um mesmo gene/condição experimental, assim como a regressão linear não sigmoideal (Apêndice VIII).

Quanto aos resultados apresentados no apêndice IX – Eficiências de amplificação, particularmente para as condições experimentais nisina nanoencapsulada relativa ao gene *lexA* e nisina livre relativa ao gene *dnaA*, todas as curvas de eficiência de amplificação foram do tipo 3 (incompleta, sem ponto de inflexão, nem segunda concavidade), inviabilizando assim a obtenção do valor correto da eficiência de amplificação, conforme já explicado. De igual maneira, para as condições experimentais lipossomo branco e nisina nanoencapsulada relativas ao gene *kat*, todas as curvas de eficiência de amplificação foram do tipo 4 (afetada por ruído em toda sua extensão).

Esperava-se que para um mesmo gene e por extensão de raciocínio para um mesmo conjunto de primers, não fossem encontradas variações entre as eficiências de amplificação de condições experimentais distintas, mas tão somente o deslocamento da curva de eficiência ao longo do eixo x. Porém, observando-se os resultados do apêndice IX – Eficiências de amplificação, percebe-se a existência de tal variação, o que sugere tratar-se de falta de convergência dos resultados, em razão do número insuficiente de curvas com as condições ideais para realização da regressão não linear sigmoideal. Assim no presente trabalho, o cálculo das eficiências de amplificação será utilizado apenas com a finalidade de confirmar que para todos os genes e condições experimentais, com os parâmetros adotados para as reações de amplificação, resultaram eficiências de aproximadamente 100%, valor este que será considerado portanto.

Um ponto a ressaltar é que a metodologia de cálculo apresentada e utilizada neste trabalho, permite a determinação da eficiência de amplificação, a partir dos próprios dados da reação, considerando portanto, as especificidades de cada reação, sem demandar a realização de trabalho adicional de bancada ou ocupar poços da placa de PCR para esta finalidade. Assim recomenda-se em

trabalhos futuros, a identificação dos fatores limitantes e utilização de uma concentração maior destes reagentes em cada poço, juntamente com o aumento do número de ciclos além de 40, a fim de deslocar a saturação da curva de amplificação para a direita, permitindo a obtenção de curvas de eficiência de amplificação completas, fora da zona afetada pelo ruído do sinal de fluorescência. Tais dados, se obtidos, permitiriam uma correção fina dos valores de Ct, o que inclusive acredita-se que teria efeito benéfico, facilitando a obtenção de significância estatística, ponto muitas vezes crítico nos trabalhos que envolvem PCR quantitativo.

Por fim, vale ressaltar que o cálculo da eficiência a partir dos dados da própria reação de amplificação, quando disponível, também constitui o estabelecimento de um critério objetivo para definição do valor de *threshold* sobre a curva de amplificação, antes realizado de forma meramente visual. Uma vez que a modelagem utilizada na dedução das expressões para quantificação relativa pressupõem uma eficiência de amplificação constante, o valor de *threshold* obrigatoriamente não poderá resultar valores de Ct situados na região de decréscimo da eficiência de amplificação.

5.3.6 Teoria de propagação de erros e a determinação correta do erro experimental

Conforme se observa da Tabela 34, a conversão do erro amostral em populacional sempre resulta na redução do erro. Já a propagação do erro pode resultar tanto em aumento como em redução do mesmo, conforme o caso. Porém a observação mais importante consiste em perceber o potencial das metodologias incorretas de estimação do erro da média populacional, a saber, erro amostral não propagado, erro amostral propagado e erro populacional não propagado, em impactar o valor correto do erro da média populacional. A título de exemplo, estas metodologias resultaram no caso do gene *virR*, numa redução do valor do erro de 13,7% (valor correto) para 1,6% da média populacional, demonstrando assim pleno potencial para tornar conclusivo um resultado que talvez não o seja. No outro extremo, foi observado no caso do gene *dnaA*, um aumento do valor do erro

de 44,3% (valor correto) para 108,7% da média populacional, demonstrando assim pleno potencial para tornar inconclusivo um resultado que talvez o seja. Estes exemplos corroboram com a divulgação da importância da correta determinação do erro experimental. Diante do exposto, cumpre ressaltar que para todas as médias populacionais apresentadas no cap. 4.6, foram calculados os respectivos erros populacionais propagados, utilizando-se para tal das Expressões 27 e 33 apresentadas no presente trabalho.

5.4 Avaliação da expressão de genes associados à resistência à nisina

5.4.1 Estudo temporal da resposta

Conforme se extrai da observação das Figuras 73, 74, 75 e 76, a resposta temporal de *L. monocytogenes* após adição de 100 mg/L de nisina livre, pode ser caracterizada por:

- Um aumento muito forte na expressão dos genes *sigB*, *ctsR*, *dnaA* e *infA* (361%, 319%, 291% e 300% do nível inicial respectivamente) e forte na expressão do gene *prfA* (161% do nível inicial). Todos os valores máximos são alcançados cerca de 60 min após a adição do peptídeo antimicrobiano no meio, com exceção de *prfA*, o qual demonstra um crescimento suave, alcançando sua expressão máxima somente 300 min após a adição, sugerindo assim um possível acúmulo de transcritos no citosol das células bacterianas. Os valores finais encontrados para a expressão dos genes *sigB*, *ctsR* e *dnaA*, sugerem uma tendência a novos *set-points* mais elevados e de *infA* à recuperação do valor inicial;

- Uma redução forte na expressão do gene *virR* (57% do nível inicial) e moderada na expressão dos genes *kat* e *lmo1433* (69% e 90% do nível inicial respectivamente). O valor mínimo na expressão de *virR* é alcançado cerca de 60 min após a adição do peptídeo antimicrobiano no meio e para os genes *kat* e *lmo1433* cerca de 120 min após a adição. Embora não constituam exatamente os valores mínimos, para fins de comparações a serem realizadas neste trabalho, os valores alcançados 60 min após a adição da nisina para os genes *kat* e *lmo1433*,

são respectivamente 89% e 91% do nível inicial. Os valores finais encontrados para a expressão de todos os genes sugerem a recuperação dos valores iniciais;

- Oscilação na expressão dos genes *lexA*, *rpoD* e *rpsL* chegando a valores máximos de 166%, 112% e 109% respectivamente e valores mínimos de 82%, 92% e 90% respectivamente, com valores finais sugerindo a recuperação dos valores iniciais.

Conforme MANDIN et al. (2005) e KANG et al. (2015), o operon *dlt*, responsável pela D-alanilação dos ácidos teicóicos (TAs) e lipoteicóicos (LTAs) da parede celular, constitui parte integrante do regulon *virR*, principal regulon descrito na literatura científica como responsável pela resistência de *L. monocytogenes* à nisina. Além do operon *dlt*, também integram o regulon *virR* o gene *mprF*, responsável pela L-lisinilação do fosfatidilglicerol da membrana celular bacteriana e o operon *anr*, responsável pelo funcionamento das bombas de efluxo, alterando portanto, a carga total do envelope celular. Desta forma, embora intuitivamente fosse esperado que a presença de nisina no meio de cultivo fosse capaz de modular a expressão de *virR* e por consequência o nível de expressão dos genes que compõem seu regulon e por sua vez a resistência à nisina, de maneira adversa não foi encontrada a superexpressão esperada de *virR*.

Porém, deve-se lembrar que segundo SMITH et al. (2013), a resposta adaptativa de tolerância ao ácido (ATR) de *L. monocytogenes*, regulada pelo gene *sigB*, também fornece proteção cruzada contra diversos agentes estressores, incluindo a nisina. BEGLEY et al. (2006), demonstraram que essa resistência cruzada decorre da regulação de *sigB* sobre genes envolvidos na reparação da parede celular, na expressão de bombas de efluxo ATP dependentes e inclusive sobre o operon *dlt*, dentre outros relacionados na Tabela 7.

De forma complementar, deve-se ainda lembrar que conforme NAIR et al. (2000), *ctsR* constitui um regulador negativo (repressor) dos genes de resposta ao estresse classe III – choque térmico de *L. monocytogenes*, sendo responsável pela expressão de proteases e chaperonas dependentes de ATP, as quais desempenham um papel importante na reciclagem de proteínas danificadas, conferindo assim uma vantagem adaptativa em situações de estresse. Porém,

além disso, LIU et al. (2013), identificaram em seu trabalho, diversos outros genes regulados por *ctsR* (os quais foram apresentados na Tabela 9 do presente trabalho), relacionados à biossíntese de ácidos graxos e fosfolipídios, biossíntese do envelope celular, proteínas de transporte e ligação, replicação, recombinação e reparo do DNA, além do gene *tefA*, cuja contribuição para resistência à nisina foi demonstrada no trabalho de COLLINS et al. (2010).

Desta forma, a modulação da resistência de *L. monocytogenes* à nisina, principalmente através dos mecanismos de repulsão eletrostática do peptídeo, reparo do envelope celular e bombeamento transmembrana de prótons, deve ser compreendida como resultado dos níveis de expressão conjuntos dos genes *virR*, *sigB* e *ctsR* e não somente de um deles. Assim, embora não tenha sido encontrada a superexpressão esperada de *virR*, tampouco a subexpressão de *ctsR*, foi observado claro e forte aumento na expressão de *sigB*, sugerindo que possivelmente esta seja a via de ativação da resistência à nisina num meio com nisina livre e sem a presença de fosfatidilcolina. Também vale ressaltar, que a permanência da expressão de *sigB* após exposição à nisina num *set-point* mais elevado, remete ao comportamento ATR+, já descrito no cap. 1.4.3.

Conforme descrito no capítulo 1.4.2, *prfA* constitui o regulon de virulência de *L. monocytogenes*, através do qual cada um dos passos da infecção intracelular, tal como invasão da célula hospedeira, escape fagossomal, replicação citosólica e disseminação célula à célula, são mediados por um de seus transcritos. Embora como mencionado não seja esperado nenhum efeito de *prfA* sobre a resistência de *L. monocytogenes* à nisina, o acúmulo de transcritos de *prfA* no citosol, caracterizado por um novo *set-point* situado acima do inicial, possivelmente em decorrência do dobramento da região UTR dos transcritos em temperaturas inferiores a 30 °C, impedindo desta forma sua tradução pelo ribossomo, pode representar infecção inicial mais grave no hospedeiro, pelas células sobreviventes à nisina.

Conforme descrito no capítulo 1.4.5, a secreção de agentes antioxidantes enzimáticos pela célula, tais como Sod, Cat, e GPx/GRd (*Imo1433*), é regulada em função da concentração de EROs na mesma. Assim embora o monitoramento da expressão do gene *sod* tenha sido excluído do presente estudo, o

comportamento coerente de redução da expressão dos genes *kat* e *lmo1433*, sugere que após a adição da nisina no meio de cultivo, não tenha ocorrido qualquer aumento relevante na concentração de EROs na célula. Isso descarta portanto, ao menos para as concentrações utilizadas, a hipótese levantada nos capítulos 1.4.5 e 1.4.6 de que este pudesse vir a constituir um mecanismo de resistência de *L. monocytogenes* à nisina. Evidentemente, estudos adicionais ainda serão necessários para ratificar esta conclusão.

Conforme descrito no capítulo 1.4.6, as células bacterianas possuem mecanismos de reparo das lesões ocorridas sobre o DNA, que conforme sua eficiência também podem vir a configurar mecanismos de resistência à nisina. Segundo os trabalhos de VEEN et al. (2010), WATSON et al. (2015) e ZAHA et al. (2012), os mecanismos de reparo por excisão de nucleotídeo (NER), recombinação homóloga e síntese translesão, são regulados conjuntamente pelos genes *recA* e *lexA*. Particularmente no caso de uma quebra de fita dupla do DNA, ocorre um aumento da expressão de *recA*, com consequente clivagem das moléculas de LexA, levando à desrepressão do sistema SOS. Por sua vez, a desrepressão do sistema SOS, leva a um aumento na expressão de *lexA*, no intuito de restabelecer o silenciamento imediato do sistema ao término da realização do reparo. Assim, embora o monitoramento da expressão do importante gene *recA* lamentavelmente tenha sido excluído do presente estudo, identificou-se uma queda na expressão de *lexA* situada entre o instante da adição até cerca de 30 min após realização da mesma, sugerindo a ocorrência da desrepressão do sistema SOS em decorrência de um aumento no número de lesões sobre o DNA. Por sua vez, esta desrepressão foi seguida por um aumento no nível de expressão de *lexA*, até 166% acima do nível em que se encontrava inicialmente, seguida por um decréscimo mais suave, o que sugere fortemente uma modulação do nível de expressão com objetivo de levar o sistema novamente a sua condição inicial de silenciamento. Além disso, foi constatado um forte aumento na expressão do gene *dnaA*, responsável pela iniciação da replicação cromossomal, o que possivelmente indica um aumento da taxa de replicação celular. Porém, conforme demonstrado por VEEN et al. (2010), um aspecto envolvido na ativação da resposta SOS consiste na inibição da divisão

celular. Estes fatos apontam para a desconsideração da hipótese levantada no cap. 1.4.6 de que a resposta SOS pudesse vir a configurar um mecanismo de resistência de *L. monocytogenes* à nisina. Mesmo assim, permanece o controverso aumento da taxa de replicação celular na presença de uma concentração bactericida de nisina, o que pode vir a constituir uma estratégia de sobrevivência. Outra possível hipótese seria a produção de cópias do DNA cromossomal, com objetivo de aumentar momentaneamente a taxa de expressão de determinados genes, a fim de conseguir responder aos danos produzidos pelo agente estressor na mesma taxa em que ocorrem, o que pode vir a constituir uma estratégia de resistência. Evidentemente, estudos adicionais também serão necessários para confirmar e esclarecer este achado.

Importante ressaltar que até a data de início da redação deste trabalho, não haviam sido localizados na literatura científica, estudos anteriores demonstrando a alteração no nível de expressão dos genes *virR*, *sigB*, *ctsR*, *prfA*, *kat*, *lmo1433*, *lexA* e *dnaA* de *L. monocytogenes*, em decorrência da presença de nisina no meio de cultivo, possivelmente sendo este o primeiro estudo a demonstrar tais relações. Desta forma não se dispõe de outros resultados para a realização de comparações.

Quanto aos genes constitutivos *rpoD*, *rpsL* e *infA*, o forte aumento na expressão de *infA* claramente o torna contraindicado para a utilização como gene de referência no presente estudo. Por outro lado, os genes *rpoD* e *rpsL*, além das oscilações de pequena amplitude em sua expressão, tendendo a um comportamento de estabilidade, demonstraram ainda perfeita complementaridade, ratificando assim sua indicação de uso combinado como fator de normalização.

5.4.2 Estudo dose dependente

Por sua vez, a partir da observação da Figura 77, pode-se concluir que aumentando-se a concentração de nisina livre de 1mg/L para 100 mg/L os efeitos dose dependentes podem ser caracterizados por:

- Um aumento muito forte na expressão dos genes *sigB* e *ctsR* (512%, e 576% dos valores obtidos na situação calibradora respectivamente);
- Uma redução forte na expressão do gene *virR* (59% do valor obtido na situação calibradora) e moderada na expressão dos genes *kat* e *Imo1433* (87% e 81% dos valores obtidos na situação calibradora respectivamente).

Conforme descrito anteriormente, a modulação da resistência de *L. monocytogenes* à nisina deve ser compreendida como resultado dos níveis de expressão simultâneos dos genes *virR*, *sigB* e *ctsR*. Assim, embora não se tenha evidenciado superexpressão de *virR*, tampouco subexpressão de *ctsR*, fica demonstrado que o valor de pico (60 min após a adição) do nível de expressão do gene *sigB* foi 512% maior na concentração 100 mg/L de nisina livre do que na concentração 1 mg/L de nisina livre, caracterizando portanto, um efeito dose dependente, sugerindo novamente que possivelmente esta seja a via de ativação da resistência à nisina na ausência de fosfatidilcolina, através dos mecanismos de repulsão eletrostática do peptídeo e reparo do envelope celular. Como já afirmado, faz-se necessária a realização de estudos adicionais.

Quanto ao comportamento coerente de redução do nível de expressão gênica de *kat* e *Imo1433* na condição experimental nisina livre 100 mg/L, comparativamente à nisina livre 1 mg/L (87% e 81% respectivamente), levanta-se a hipótese que as concentrações de EROs em ambas as condições não sejam significativas e portanto, na concentração de 100 mg/L, onde o envelope celular esta sendo danificado com maior intensidade, a célula bacteriana direcione seu metabolismo para outras prioridades, reduzindo assim a expressão dos genes *kat* e *Imo1433*. Outros estudos serão necessários para sustentar tanto este achado quanto a hipótese elaborada.

Salienta-se que até a data de início da redação deste trabalho, não haviam sido localizados na literatura científica estudos anteriores demonstrando a modulação do nível de expressão de *sigB* pela concentração de CAMPs no meio de cultivo (fato anteriormente apontado na Figura 25), possivelmente sendo este o primeiro estudo a demonstrar tal relação.

5.4.3 Expressão gênica diferencial

Através da observação da Figura 78, pode-se concluir que a expressão diferencial de nisina nanoencapsulada em lipossomos, comparativamente ao emprego da nisina na sua forma livre na concentração de 100 mg/L, 60 min após as respectivas adições, pode ser caracterizada por:

- Um aumento extremamente forte na expressão dos genes *ctsR*, *dnaA* e *virR* (2.004%, 1.500% e 4.764% do valor obtido na situação calibradora respectivamente) e muito forte na expressão dos genes *prfA* e *lmo1433* (583% e 234% do valor obtido na situação calibradora respectivamente);

- Uma redução muito forte na expressão do gene *kat* (32% do valor obtido na situação calibradora).

Cumprе ressaltar, que embora o gene *sigB* venha demonstrando papel relevante nas adições com nisina livre, conforme já descrito em capítulo anterior os dados relativos ao gene *sigB* nas condições experimentais lipossomo branco e nisina nanoencapsulada foram excluídos do presente estudo. Assim, a ausência de informações sobre o referido gene nesta análise, não pode ser interpretada como ausência de alteração no nível de expressão do mesmo, nem mesmo como insuficiência de relevância estatística. Uma segunda ressalva não menos importante, consiste que todos os *time-points* de extração de RNA relativos às condições experimentais lipossomo branco e nisina nanoencapsulada, conforme demonstra o gráfico da Figura 54, foram realizados numa fase caracterizada pelo início de um segundo crescimento exponencial, superando inclusive a curva de crescimento do cultivo sem o emprego da nisina, o que permite levantar a hipótese que possivelmente as bactérias estejam utilizando a parede de fosfatidilcolina dos lipossomos como substrato para realização de seu metabolismo, assim como, conforme demonstrado por DA SILVA et al. (2014), ainda não ocorreu a liberação de nisina no meio em concentrações bactericidas (até 60 min após a adição), diferindo portanto dos cultivos com estas

concentrações de nisina livre, onde o metabolismo das células está reprogramado em resposta à presença do agente estressor.

Conforme descrito no capítulo 1.4.2, *prfA* constitui o regulon de virulência de *L. monocytogenes*, responsável pela síntese dos fatores de virulência envolvidos em cada um dos passos da infecção intracelular. Também foram descritos detalhadamente os diversos mecanismos de regulação envolvidos a fim de impedir que a síntese de tais fatores possa ocorrer fora do hospedeiro. Por esta razão, surpreende o aumento muito forte (583%) encontrado na expressão de *prfA*. Uma possível hipótese explicativa seria que a fosfatidilcolina presente na formulação dos lipossomos, componente que também está presente nas membranas celulares eucarióticas, esteja fornecendo uma sinalização equivocada para o microrganismo de que ele esteja dentro do hospedeiro. Outra hipótese é que conforme descrito ao longo do trabalho, dentre os diversos genes integrantes do regulon *prfA*, encontram-se os genes *plcB*, responsável pela síntese da fosfolipase B, capaz de degradar a maioria dos fosfolipídios de membrana, e o gene *hly*, responsável pela síntese de listeriolisina O, a qual realiza a lise da membrana do fagossomo formado na invasão do enterócito (TRABULSI & ALTERTHUM, 2008). Assim, a expressão de *prfA* estaria sendo realizada com objetivo de produzir as enzimas necessárias à degradação da parede de fosfatidilcolina dos lipossomos para sua suposta utilização como substrato no metabolismo de *L. monocytogenes*.

Além disso, diferentemente dos resultados obtidos com nisina livre, foi identificado pela primeira vez no presente estudo um aumento na expressão de *virR* (*virulence regulator*). Embora o monitoramento da expressão de *prfA*, tenha sido definido como um objetivo secundário no presente trabalho, o fato de ter sido encontrado um aumento muito forte do seu nível de expressão, apesar dos diversos mecanismos de regulação para que isso não ocorra fora do hospedeiro, configurou um achado de grande importância, permitindo levantar a hipótese de que a expressão de *virR* possivelmente também seja dependente desta sinalização. Assim, combinada à manutenção do nível de expressão de *sigB* na condição experimental nisina nanoencapsulada (caso esta venha a ser demonstrada em estudo futuro), o aumento extremamente forte no nível de

expressão de *virR* (4.764%) seria suficiente para caracterizar um mecanismo de resistência intrínseco de *L. monocytogenes* à nisina, na presença de fosfatidilcolina, sinalização que também pode estar presente em diversos alimentos, inclusive sendo uma possível explicação para o fato paradoxal da fonte de contaminação humana ser predominantemente constituída por alimentos de origem animal, apesar do caráter amplamente ubíquo do microrganismo.

Também cabe ressaltar o aumento extremamente forte encontrado no nível de expressão do gene *dnaA* (1.500%), reponsável pela iniciação da replicação cromossomal. Mesmo sendo a concentração de nisina livre no meio, 60 min após a adição dos lipossomos, inferior à concentração de 100 mg/L utilizada no estudo dose dependente, paradoxalmente foi observado um aumento no nível de expressão de *dnaA*, muito superior ao observado naquela condição experimental. Uma hipótese levantada para explicação deste achado, seria que além de já haver uma concentração expressiva de nisina livre no meio de cultivo, embora inferior à 100 mg/L, também haveria no cultivo com adição de lipossomos uma disponibilidade energética muito maior, decorrente da utilização da fosfatidilcolina como substrato no metabolismo de *Listeria monocytogenes*, possibilitando assim uma resposta bem mais intensa que no cultivo com 100 mg/L de nisina livre.

Salienta-se que até a data de início da redação deste trabalho, não haviam sido localizados na literatura científica estudos anteriores demonstrando a expressão gênica diferencial dos genes *prfA*, *ctsR*, *virR*, *dnaA*, *kat* e *lmo1433* em *L. monocytogenes*, submetida à condição experimental nisina nanoencapsulada, possivelmente sendo este o primeiro estudo a demonstrar tais relações e as conclusões apontadas acima. Evidentemente estas importantes suspeitas levantadas a partir dos resultados obtidos no presente trabalho, relativas à sinalização e regulação da virulência e resistência à nisina de *L. monocytogenes*, carecem da realização de diversos estudos adicionais para sua completa elucidação.

Diante dos resultados apontados, mesmo considerando que a concentração de nisina liberada no meio ainda seja reduzida, torna-se inevitável o questionamento sobre qual parcela destas alterações seja decorrente da

liberação gradual da nisina e qual seja decorrente da inserção do lipossomo de fosfatidilcolina no meio de cultivo. Uma tendência natural seria analisar o nível de expressão gênica relativa entre o lipossomo branco e a nisina livre na concentração 100 mg/L, 60 min após as respectivas adições (3XX3/2XX3-100), conforme sintetizado na Figura 79. Porém, tal análise acumula efeitos decorrentes de duas diferenças. A primeira delas obviamente consiste na inserção dos lipossomos de fosfatidilcolina no meio de cultivo. Porém, além disso, há a retirada da nisina do meio de cultivo, a qual estava presente na situação calibradora, sendo portanto, contraindicada a utilização dos resultados desta análise para a finalidade proposta. Como alternativa, o presente trabalho propõe a análise do nível de expressão gênica relativa entre o lipossomo branco e a nisina livre na concentração 1 mg/L, 60 min após as respectivas adições (3XX3/2XX3-001), conforme sintetizado na Figura 80, uma vez que tal concentração apresentou fraca atividade antimicrobiana (Figuras 50 e 52) e se aproxima de uma condição controle (sem antimicrobiano). Assim, baseando-se nessa observação, pode-se concluir que a adição dos lipossomos produzidos no meio de cultivo resultaram num aumento muito forte na expressão dos genes *prfA*, *virR* e *dnaA* (266%, 303% e 293% dos valores obtidos na situação calibradora respectivamente) e uma redução muito forte na expressão do gene *kat* (12% do valor obtido na situação calibradora).

Comparando estes resultados com aqueles obtidos para a expressão diferencial entre as condições experimentais nisina nanoencapsulada e nisina livre na concentração de 100 mg/L, 60 min após as respectivas adições (4XX3/2XX3-100), obtêm-se os resultados apresentados na Tabela 35.

Tabela 35 – Comparação entre as expressões diferenciais obtidas para os genes *prfA*, *ctsR*, *dnaA*, *virR*, *kat* e *lmo1433*. Fonte: O autor

Análise	<i>prfA</i>	<i>ctsR</i>	<i>dnaA</i>	<i>virR</i>	<i>kat</i>	<i>1433</i>
4XX3/2XX3-100	583,0%	2004,1%	1500,1%	4764,2%	32,1%	233,9%
3XX3/2XX3-001	265,5%	100,0%	292,8%	303,4%	12,3%	100,0%

A partir da observação dos mesmos, pode-se constatar que um aumento muito forte na expressão de *prfA* e *virR* já estão presentes em 3XX3/2XX3-001,

corroborando com a hipótese que a ativação da superexpressão destes genes esteja associada à presença da fosfatidilcolina no meio de cultivo. Além disso, percebe-se que uma vez ativada a superexpressão de *virR*, ela é dose dependente em relação à concentração de nisina no meio de cultivo (aumentando a concentração de nisina livre em cerca de 25X, decorre um aumento de aproximadamente 16X na expressão de *virR*), corroborando com a suspeita que este gene seja o principal modulador da resistência intrínseca de *L. monocytogenes* à nisina, na presença de fosfatidilcolina. Outra relevante constatação é que um aumento muito forte na expressão de *dnaA* também já está presente em 3XX3/2XX3-001, corroborando com a hipótese que a fosfatidilcolina esteja sendo utilizada como substrato no metabolismo do microrganismo, subsidiando assim um aumento na sua taxa de crescimento. Este achado está em perfeito alinhamento com a demonstração na Figura 54, de uma segunda fase log nas curvas de crescimento relativas às condições experimentais lipossomo branco e nisina nanoencapsulada. Por fim, um último aspecto a ser ressaltado consiste que as superexpressões de *prfA* e *dnaA* também se demonstraram sensíveis em relação a concentração de nisina livre no meio de cultivo, corroborando com as hipóteses que estejam associadas a uma necessidade de aumento da degradação da fosfatidilcolina para fins energéticos e de aumento da taxa de replicação cromossomal, seja como estratégia de sobrevivência ou estratégia de resistência.

6. Conclusões

Foi demonstrado através das curvas de crescimento levantadas, limitando-se ao período transcorrido até 3 h após o instante das respectivas adições, a ocorrência de uma forte redução do efeito inibitório da nisina nanoencapsulada comparativamente à nisina livre nas concentrações de 100 mg/L e 10 mg/L, inclusive tendo sido demonstrado para ambos os tipos de lipossomos, a ocorrência a partir de 2 h após a adição, de um aumento da taxa de crescimento de *L. monocytogenes* superior até mesmo ao cultivo sem adição de nisina. Foi formulada uma possível hipótese para explicação das observações encontradas.

Também foi caracterizada através da metodologia de PCR em tempo real com transcrição reversa (RT-qPCR), a resposta temporal de *L. monocytogenes* à nisina livre na concentração de 100 mg/L, o estudo dose dependente abrangendo as concentrações de 100 mg/L e 1 mg/L de nisina livre e a expressão gênica diferencial entre nisina nanoencapsulada em lipossomos de fosfatidilcolina do tipo LUV e nisina livre na concentração de 100 mg/L. Foram demonstradas alterações estatisticamente significativas no nível de expressão dos reguladores *virR*, *sigB*, *ctsR* e *prfA*, além dos genes associados à secreção de antioxidantes enzimáticos *kat* e *Imo1433* e dos genes associados aos mecanismos de reparo de lesões no DNA *lexA* e início da replicação cromossomal *dnaA*, todas associadas à resposta do microrganismo à adição de nisina em sua forma livre ou na forma nanoencapsulada, inclusive, muitas das quais possivelmente constituem o primeiro relato realizado na literatura científica. Também foram formuladas diversas hipóteses justificativas para os achados encontrados.

Consoante com as discussões realizadas ao longo do capítulo 5, faz-se necessária a realização de outros estudos adicionais para confirmação dos diversos achados e hipóteses levantadas. Além disso, seja devido à formação de produtos de amplificação indesejados detectados através das curvas de melting ou seja devido ao comportamento divergente da curva de amplificação em relação às respectivas replicatas técnicas, resultando na exclusão dos valores de Ct de algumas amostras, foram identificadas lacunas remanescentes do presente

trabalho, as quais são relacionadas a seguir, abrindo-se portanto, oportunidade para a realização de investigações complementares:

- Gene *sigB*, condições experimentais nisina nanoencapsulada e lipossomo branco;
- Genes *sod* e *recA*, todas as condições experimentais.

Também foram identificados alguns pontos de melhoria, os quais são apresentados a seguir, como sugestão a ser adotada na realização de trabalhos posteriores:

- Aumentar o número de replicatas biológicas de três para quatro;
- Após realizar a caracterização dos lotes de lipossomos, dentre aqueles que forem selecionados para extração de RNA, realizar homogeneização interlotes, seguida de nova caracterização para fins de reprodutibilidade do estudo, previamente à adição do mesmo, reduzindo assim a amplitude da divergência de resposta entre as replicatas biológicas;
- Utilizar como condições experimentais, nisina livre na concentração de 100 mg/L, nisina nanoencapsulada e nisina livre na concentração de 100 mg/L juntamente com lipossomo branco, a fim de possibilitar a identificação exata da contribuição da inserção de lipossomos de fosfatidilcolina no meio de cultivo e da nanoencapsulação da nisina ao invés de utilizá-la na forma livre;
- Levantar as curvas de crescimento de todos os cultivos, desde o instante da adição até 12 h subsequentes;
- Realizar extrações de RNA para os lipossomos branco e de nisina em diversos outros pontos das curvas de crescimento, a fim de melhor compreender como se dá a variação da expressão gênica ao longo destas curvas.
- Repetir o experimento utilizando outros fosfolipídios para produção dos lipossomos, tal como fosfatidilglicerol ou testar a encapsulação da nisina em nanoestruturas produzidas com outros materiais, tais como nanopartículas lipídicas sólidas, nanopartículas lipídicas sólidas revestidas, nanopartículas

poliméricas, nanofibras ou nanotubos, a fim de detectar se para algum dos materiais empregados, não ocorre aumento na expressão de *virR*.

Cumprir mencionar que ainda foi realizado no presente trabalho o estudo de possíveis mecanismos de resistência à nisina e respectivos genes envolvidos, a produção e caracterização de lipossomos de fosfatidilcolina, além do estudo das principais fontes de erro envolvidas na quantificação relativa da expressão gênica através da metodologia de RT-qPCR, objetivando a obtenção de resultados consistentes. Particularmente no que tange a este último assunto, foram ainda deduzidas uma expressão geral para determinação do nível de expressão gênica relativa, uma metodologia para cálculo da eficiência de amplificação individualizada para cada replicata utilizando os próprios dados da reação de PCR e algumas expressões abrangendo as necessidades mais frequentes de propagação de erros, possivelmente configurando contribuições do presente estudo ao tema do PCR quantitativo, uma vez que não foram encontrados conteúdos semelhantes na literatura científica. Por todo o acima exposto, pode-se afirmar que os objetivos geral e específicos descritos no cap. 2 foram plenamente alcançados.

7. Referências bibliográficas

- ABACHIN, E.; POYART, C.; PELLEGRINI, E.; MILOHANIC, E.; FIEDLER, F.; BERCHE, P. & TRIEU-CUOT, P. Formation of D-alanyl-lipoteichoic acid is required for adhesion and virulence of *Listeria monocytogenes*. *Molecular Microbiology*, 43(1): 1–14, 2002.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Bulário eletrônico. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/datavisa/fila_bula/index.asp>. Acesso em: 21/10/2019.
- AKBARZADEH, A.; REZAEI-SADABADY, R.; DAVARAN, S.; JOO, S.W.; ZARGHAMI, N.; HANIFEHPOUR, Y.; SAMIEI, M.; KOUHI, M. & NEJATI-KOSHKI, K. Liposome: classification, preparation, and applications. *Nanoscale Research Letters*, 8: 1-9, 2013.
- ALLEN, T.M. & CULLIS, P.R. Liposomal drug delivery systems: from concept to clinical applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 65: 36-48, 2013.
- ANDERSEN, C. L.; JENSEN, J. L. & ORNTOFT, T. F. Normalization of real-time quantitative reverse transcription PCR data: A model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Research*, 64: 5245-5250, 2004.
- ANTIMICROBIAL PEPTIDE DATABASE. Banco de dados e ferramenta de análise de peptídeos antimicrobianos. Disponível em: <<https://wangapd3.com/main.php>>. Acesso em: 03/05/2021.
- APPLIED BIOSYSTEMS 7500 Software. Versão 2.0.6. [S.l.]: Life Technologies Corporation, 2011.
- AUTODIMER Software. Versão de 23/10/2017. Gaithersburg: National Institute of Standards and Technology (NIST) - Department of commerce USA. Disponível para download gratuito em : <<https://strbase.nist.gov/AutoDimerHomepage/AutoDimerProgramHomepage.htm>>. Acesso em: 31/03/2020.
- BACTIBASE. Base de dados e ferramenta para caracterização de bacteriocinas. Disponível em: <<http://bactibase.hammamilab.org/main.php>>. Acesso em: 08/04/2019.

- BAGEL. Ferramenta baseada na web para mineração de genomas de bacteriocinas. Disponível em: <<http://bagel4.molgenrug.nl/>>. Acesso em: 08/04/2019.
- BAKKER-WOUDENBERG, I.A.J.M. Long-circulating sterically stabilized liposomes as carriers of agents. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 19: 299-311, 2002.
- BARBOSA, K. B. F.; COSTA, N. M. B.; ALFENAS, R. C. G.; DE PAULA, S. O.; MINIM, V. P. R. & BRESSAN, J. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. *Revista Nutrição*, 23(4): 629-643, 2010.
- BEGLEY, M.; HILL, C. & ROSS R. P. Tolerance of *Listeria monocytogenes* to cell envelope-acting antimicrobial agents is dependent on *sigB*. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(3): 2231-2234, 2006.
- BENECH, R.-O.; KHEADR, E.E.; LACROIX, C. & FLISS, I. Antibacterial activities of nisin Z encapsulated in liposomes or produced in situ by mixed culture during cheddar cheese ripening. *Applied Environment Microbiology*, 68: 5607-5619, 2002.
- BERRA, C. M.; MENCK, C. F. M. N. & DI MASCIO, P. Estresse oxidativo, lesões no genoma e processos de sinalização no controle do ciclo celular. *Química Nova*, 29(6): 1340-1344, 2006.
- BESTKEEPER software. Versão 1. [S.l.]: [s.n.] ,2004. Disponível para download gratuito em: <<https://www.gene-quantification.de/bestkeeper.html#download>>. Acesso em: 27/04/2020.
- BONNET, M. & MONTVILLE, T.J. Acid-tolerant *Listeria monocytogenes* persist in a model food system fermented with nisin-producing bacteria. *Letters in Applied Microbiology*, 40: 237-242, 2005.
- BONNET, M.; RAFI, M. M.; CHIKINDAS, M. L. & MONTVILLE, T.J. Bioenergetic mechanism for nisin resistance, induced by the acid tolerance response of *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(4): 2556-2563, 2006.
- BRANDELLI, A. Nanostructures as promising tools for delivery of antimicrobial peptides. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 12: 731-741, 2012.

- BRANDELLI, A.; PINILLA, C.M.B. & LOPES, N.A. Nanoliposomes as a Platform for Delivery of Antimicrobials. In: *Nanotechnology Applied To Pharmaceutical Technology*. Springer International Publishing, Cap. 3, p. 55-90 , 2017
- BREHM, K.; RIPIO, M-T.; KREFT, J. & VAZQUEZ-BOLAND, J.A. The bvr locus of *Listeria monocytogenes* mediates virulence gene repression by β -glucosides. *Journal of Bacteriology*, 181: 5024-5032, 1999.
- BROTZ, H.; JOSTEN, M.; WIEDEMANN, I.; SCHNEIDER, U.; GOTZ, F.; BIERBAUM, G. & SAHL, H. G. Role of lipid-bound peptidoglycan precursors in the formation of pores by nisin, epidermin and other lantibiotics. *Molecular Microbiology*, 30: 317–327, 1998.
- BSEISO, E.; NASR, M.; SAMMOUR, O. & GAWAD, A. Recent advances in topical formulation carriers of antifungal agents. *Indian Journal of Dermatology Venereology and Leprology*, 81: 457-463, 2015.
- BUSTIN, S. A. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of Molecular Endocrinology*, 25: 169-193, 2000.
- CAMEJO, A.; BUCHRIESER, C.; COUVE, E.; CARVALHO, F.; REIS, O.; FERREIRA, P.; SOUSA, S.; COSSART, P. & CABANES, D. *In vivo* transcriptional profiling of *Listeria monocytogenes* and mutagenesis identify new virulence factors involved in infection. *PLoS Pathogens*, 5(5): 1-22, 2009.
- CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. National *Listeria* surveillance annual summary, 2014. Atlanta: CDC, 2015.
- CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Surveillance system overview: the *Listeria* initiative. Atlanta: CDC, 2016.
- CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Portal sobre Listeriose. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/listeria/index.html>>. Acesso em: 13/01/2019.
- CHATTERJEE, S.S.; HOSSAIN, H.; OTTEN, S.; KUENNE, C.; KUCHMINA, K.; MACHATA, S.; DOMANN, E.; CHAKRABORTY, T. & HAIN, T. Intracellular gene expression profile of *Listeria monocytogenes*. *Infection and Immunity*, 74(2): 1323-1338, 2006.

- CHOMCZYNSKI, P. & SACCHI, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry*, 162(1): 156-159, 1987.
- CHOMCZYNSKI, P. & SACCHI, N. The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on. *Nature Protocols*, 1(2): 581-585, 2006.
- COLAS, J.C.; SHI, W.; RAO, V.S.N.M.; OMRI, A.; MOZAFARI, M.R. & SINGH, H. Microscopical investigations of nisin-loaded nanoliposomes prepared by mozafari method and their bacterial targeting. *Micron*, 38: 841-847, 2007.
- COLLINS, B.; JOYCE, S.; HILL, C.; COTTER, P.D. & ROSS, R.P. TefA contributes to the innate resistance of *Listeria monocytogenes* to nisin and other cell wall-acting antibiotics. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54(11): 4658-4663, 2010.
- COTTER, P.D.; ROSS, R.P. & HILL, C. Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nature Reviews Microbiology*, 3(1): 777-788, 2005.
- COTTER, P.D.; ROSS, R.P. & HILL, C. Bacteriocins – a viable alternative to antibiotics? *Nature Reviews Microbiology*, 11(2): 95-105, 2013.
- COX, M. M.; DOUDNA, J. A. & O'DONNELL, M. *Biologia molecular: princípios e técnicas*. Porto Alegre: Artmed, 2012. cap.12-13, pág. 424-475.
- DA SILVA, I. M.; BOELTER, J. F.; DA SILVEIRA, N. P. & BRANDELLI, A. Phosphatidylcholine nanovesicles coated with chitosan or chondroitin sulfate as novel devices for bacteriocin delivery. *Journal of Nanoparticle Research*, 7(16): 2479-, 2014.
- DERRÉ, I.; RAPOPORT, G. & MSADEK, T. CtsR, a novel regulator of stress and heat shock response, controls clp and molecular chaperone gene expression in gram-positive bacteria. *Molecular Microbiology*, 31(1): 117-131, 1999.
- DRULIS-KAWA, J. & DOROTKIEWICZ-JACK, A. Liposomes as delivery systems for antibiotics. *International Journal of Pharmaceutics*, 387: 187-198, 2010.
- EL JASTIMI, R.; EDWARDS, K. & LAFLEUR, M. Characterization of permeability and morphological perturbations induced by nisin on phosphatidylcholine membranes. *Biophysical Journal*, 77: 842-852, 1999.

- EL JASTIMI, R. & LAFLEUR, M. Nisin promotes the formation of nonlamellar inverted phases in unsaturated phosphatidylethanolamines. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1418: 97-105, 1999.
- ERMOLAEVA, E.; 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*, 52: 601-611, 2004.
- FREEMAN, S. Biological science. Hoboken: Pearson Prentice Hall, 2005. cap. 1.3.
- GADKAR, V.J. & FILION, M. Development of a versatile taqMan real-time quantitative PCR (RT-qPCR) compliant anchor sequence to quantify bacterial gene transcripts from RNA samples containing carryover genomic DNA. *BMC Biotechnology*, 13(7): 1-11, 2013.
- GENBANK. Genoma *Listeria monocytogenes* EGD-e, Acession Number NC_003210.1. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>>. Acesso em: 09/08/2018.
- GENORM. Site oficial do algoritmo. Disponível em : <<https://genorm.cmgg.be/>>. Acesso em: 25/04/2020.
- GENTLE, A.; ANASTASOPOULOS, F. & MCBRIEN, N. A. High-resolution semi-quantitative real-time PCR without the use of a standard curve. *BioTechniques*, 31: 502-508, 2001.
- GHARSALLAOUI, A.; OULAHAL, N.; JOLY, C. & DEGRAEVE, P. Nisin as a food preservative: part 1: physicochemical properties, antimicrobial activity and main uses. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 56(8): 1262-1274, 2016.
- GRUBAUGH, D.; REGEIMBAL, J.; GHOSH, P.; ZHOU, Y.; LAUER, P.; DUBENSKY JR., T. & HIGGINS, D. The VirAB ABC transporter is required for VirR regulation of *Listeria monocytogenes* virulence and resistance to nisin. *Infection and Immunity*, 86(3): 1-17, 2018.
- HUANG, Z.; LI, X.; ZHANG, T.; SOMG, Y.; SHE, Z.; LI, J. & DENG, Y. Progress involving new techniques for liposome preparation. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 9: 176-182, 2014.

- ITA, P. S. & HUTKINS, R. W. Intracellular pH and survival of *Listeria monocytogenes* Scott A in tryptic soy broth containing acetic, lactic, citric and hydrochloric acids. *Journal of Food Protection*, 54: 15-19, 1990.
- JACK, R.W.; TAGG, J.R. & RAY, B. Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Microbiological Reviews*, 59(2): 171-200, 1995.
- JOZALA, A. F.; NOVAES, L. C. L. & JUNIOR, A. P. *Concepts, compounds and the alternatives of antibacterials*. Londres: InTechOpen, 2015. Cap. 5, p. 103-119.
- KANG, J.; WIEDMANN, M.; BOOR, K. & BERGHOLZ, T. VirR-mediated resistance of *Listeria monocytogenes* against food antimicrobials and cross-protection induced by exposure to organic acid salts. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(13): 4553-4562, 2015.
- KAWAI, Y.; MORIYA, S. & OGASAWARA, N. Identification of a protein, YneA, responsible for cell division suppression during the SOS response in *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology*, 47(4): 1113-1122, 2003.
- KELLEY, W. L. Lex marks the spot: the virulent side of SOS and a closer look at the *lexA* regulon. *Molecular Microbiology*, 62: 1228-1238, 2006.
- KJOS, M.; NES, I. F. & DIEP D. B. Mechanisms of resistance to bacteriocins targeting the mannose phosphotransferase system. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(10): 3335–3342, 2011.
- KLAENHAMMER, T.R. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 12(9): 39-85, 1993.
- LARIDI, R.; KHEADR, E.E.; BENECH, R.-O.; VUILLEMARD, J.C.; LACROIX, C. & FLISS, I. Liposome encapsulated nisin Z: optimization, stability and release during milk fermentation. *International Dairy Journal*, 13: 325-336, 2003.
- LEIMEISTER-WACHTER, M.; DOMANN, E. & CHAKRABORTY, T. The expression of virulence genes in *Listeria monocytogenes* is thermoregulated. *Journal of Bacteriology*, 174: 947-952, 1992.
- LIU, W. & SAINT, D. A. A new quantitative method of real time reverse transcription polymerase chain reaction assay based on simulation of polymerase chain reaction kinetics. *Analytical Biochemistry*, 302: 52-59, 2002.

- LIU, W. & SAINT, D. A. Validation of a quantitative method for real time PCR kinetics. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 294: 347-353, 2002a.
- LIU, Y.; MORGAN, S.; REAM, A. & HUANG, L. Gene expression profiling of a nisin-sensitive *Listeria monocytogenes* scott A ctsR deletion mutant. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 40: 495-505, 2013.
- LIVAK, K.J. & SCHMITTGEN, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method. *Methods*, 25: 402-408, 2001.
- LUTHA, S.; BOONEA, I.; KLETAA, S. & AL DAHOUKA, SASCHA. Analysis of RASFF notifications on food products contaminated with *Listeria monocytogenes* reveals options for improvement in the rapid alert system for food and feed. *Food Control*, 96: 479-487, 2019.
- MAHERANI, B.; ARAB-TEHRANY, E.; MOZAFARI, M.R.; GAIANI, C. & LINDER, M. Liposomes: a review of manufacturing techniques and targeting strategies. *Current Nanoscience*, 7: 436-452, 2011.
- MALHEIROS, P. S.; DAROIT, D. J. & BRANDELLI, A. Food applications of liposome-encapsulated antimicrobial peptides. *Trends in Food Science & Technology*, 21: 284–292, 2010a.
- MALHEIROS, P.S.; MICHELETTO, Y.M.S.; SILVEIRA, N.P. & BRANDELLI, A. Development and characterization of phosphatidylcholine nanovesicles containing the antimicrobial peptide nisin. *Food Research International*, 43: 1198-1203, 2010b.
- MALHEIROS, P. S.; DAROIT, D. J.; SILVEIRA, N. P. & BRANDELLI, A. Effect of nanovesicle-encapsulated nisin on growth of *Listeria monocytogenes* in milk. *Food Microbiology*, 27: 175–178, 2010c.
- MALVERN PANALYTICAL. Data and size results by dynamic light scattering. Malvern: Malvern Panalytical Ltd, 2012.
- MANDIN, P.; FSIHI, H.; DUSSURGET, O.; VERGASSOLA, M.; MILOHANIC, E.; TOLEDO-ARANA, A.; LASA, I.; JOHANSSON, J. & COSSART, P. VirR, a response regulator critical for *Listeria monocytogenes* virulence. *Molecular Microbiology*, 57(5): 1367-1380, 2005.

- MENGAUD, J.; DRAMSI, S.; GOUIN, E.; VÁZQUEZ-BOLAND, J.A.; MILON, G. & COSSART, P. Pleiotropic control of *Listeria monocytogenes* virulence factor by a gene which is autoregulated. *Molecular Microbiology*, 5: 2273-2283, 1991.
- MERTINS, O.; SEBBEN, M.; SCHNEIDER, P.H.; POHLMANN, A.R. & SILVEIRA, N.P. Characterization of soybean phosphatidylcholine purity by H and P NMR. *Química Nova*, 31: 1856-1859, 2008.
- MILOHANIC, E.; GLASER, P.; COPPÉE, J.Y.; FRANGEUL, L.; VEGA, Y.; VÁZQUEZ-BOLAND, J.A.; KUNST, F.; COSSART, P. & BUCHRIESER, C. Transcriptome analysis of *Listeria monocytogenes* EGDe identifies three groups of genes differently regulated by PrfA. *Molecular Microbiology*, 47: 1613-1625, 2003.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. Mortalidade geral, período 2007-2016, Categoria CID-10 A32-Listeriose. Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sim/cnv/obt10uf.def>. Acesso em: 13/01/2019.
- MOZAFARI, M.R.; JOHNSON, C.; HATZIANTONIOU, S. & DEMETZOS, C. Nanoliposomes and their applications in food nanotechnology. *Journal of Liposome Research*, 18: 309-327, 2008.
- MUGABE, C.; HALWANI, M.; AZGHANI, A.O.; LAFRENIE, R.M. & OMRI, A. Mechanism of enhanced activity of liposome-entrapped aminoglycosides against resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50: 2016-2022, 2006.
- MURRAY, P.R. *Manual of clinical microbiology*. 9a ed. Washington : American Society for Microbiology, 2007. cap. 33, p. 474-480.
- MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S. & PFALLER, M. A. *Microbiologia médica*. 7a ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2014. cap. 22, p. 216-219.
- NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. Primer Blast. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>. Acesso em: 18/09/2018.
- NAIR, S.; DERRÉ, I.; MSADEK, T.; GAILLOT, O. & BERCHÉ, P. CtsR controls class III heat shock gene expression in the human pathogen *Listeria monocytogenes*. *Molecular Microbiology*, 35(4): 800-811, 2000.

- NEJAD, E. E.; ALMANI, P. G. N.; MOHAMMADI, M. A. & SALARI, S. Molecular identification of candida isolates by real-time pcr-high-resolution of the genetic diversity of candida species. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 34(10): 1-8, 2020.
- NELSON, D.L. & COX, M.M. *Princípios de bioquímica de Lehninger*. 6a ed. Porto Alegre: ArtMed, 2014.
- NORMFINDER. Site oficial do algoritmo. Disponível em: <<https://moma.dk/normfinder-software>>. Acesso em: 26/04/2020.
- O'DRISCOLL, B.; GAHAN, C.G.M. & HILL, C. Adaptive acid tolerance response in *Listeria monocytogenes*: isolation of an acid-tolerant mutant which demonstrates increased virulence. *Applied Environmental Microbiology*, 62: 693–1698, 1996.
- PATTON, G. C. & VAN DER DONK, W. A. New developments in lantibiotic biosynthesis and mode of action. *Current opinion in microbiology*, 8(5): 543-551, 2005.
- PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acid Research*, 29(9): 2002-2007, 2001.
- PFAFFL, M. W.; TICHOPAD, A.; PRGOMET, C. & NEUVIANS, T. P. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated genes target and sample integrity: bestKeeper – excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnology Letters*, 26: 509-515, 2004.
- PEIRSON, S. N.; BUTLER, J. N. & FOSTER, R. G. Experimental validation of novel and conventional approaches to quantitative realtime PCR data analysis. *Nucleic Acids Research*, 31: 3-7, 2003.
- POPOVSKA, O.; SIMONOVSKA, J.; KAVRAKOVSKI, Z. & RAFAJLOVSKA, V. An overview: methods for preparation and characterization of liposomes as drug delivery systems. *International Journal of Pharmaceutical and Phytopharmacological Research*, 3: 182-189, 2013.
- PRIMER 3 Plus Software. Versão 2.4.2 [S.l.]: Whitehead Institute for Biomedical Research, 2012. Disponível para download gratuito em: <<https://primer3plus.com/>>. Acesso em: 02/04/2020.

- PROKOP, A.; GOUIN, E.; VILLIERS, V.; NAHORI, M-A.; VINCENTELLI, R.; DUVAL, M.; COSSART, P. & DUSSURGET, O. OrfX, a nucleomodulin required for *Listeria monocytogenes* virulence. *Mbio.asm.org*, 8(5): 1-17, 2017.
- RADOSHEVICH, L. & COSSART, P. *Listeria monocytogenes*: towards a complete picture of its physiology and pathogenesis. *Nature Reviews Microbiology*, 16: 32-46, 2018.
- RAENGPRADUB, S., WIEDMANN, M. & BOOR, K.J. Comparative analysis of the sigma B-dependent stress responses in *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* strains exposed to selected stress conditions. *Applied Environmental Microbiology*, 74: 158–171, 2008.
- RAMNATH, M.; BEUKES, M.; TAMURA, K. & HASTINGS, J. W. Absence of a putative mannose-specific phosphotransferase system enzyme IIAB component in a leucocin A-resistant strain of *Listeria monocytogenes*, as shown by two-dimensional sodium dodecyl sulfatepolyacrylamide gel electrophoresis. *Applied Environmental Microbiology*, 66: 3098–3101, 2000.
- RAPID ALERT SYSTEM FOR FOOD AND FEED. Banco de dados de acesso público sobre notificações de segurança alimentar da união europeia. Disponível em: <https://ec.europa.eu/food/safety/rasff_en>. Acesso em: 03/05/2021.
- Real Time PCR Handbook. [S.l]: Thermo Fisher Scientific, 2016. 68p.
- REZONI, 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*. 34, 552-561, 1999.
- RIAZ, M. Liposomes preparation methods. *Pakistan Journal Pharmaceutical Sciences*, 19: 65-77, 1996.
- ROCHE APPLIED SCIENCE. Technical note LC 13/2001 - relative quantification. Mannheim: Roche, 2001. 28p.
- ROCHE MOLECULAR BIOCHEMICALS. Technical note LC 9/2000 – optimization strategy. Mannheim: Roche, 2000. 20p.
- SCORTTI, M.; MONZÓ, H.J.; LACHARME-LORA, L.; LEWIS, D.A. & VÁZQUEZ-BOLAND, J.A. The *prfA* virulence regulon. *Microbes and Infection*, 9: 1196-1207, 2007.

- SINGH, P. & MUSTAPHA, A. Development of a real-time PCR melt curve assay for simultaneous detection of virulent and antibiotic resistant *salmonella*. *Food Microbiology*, 44(5): 6-14 , 2014.
- SKOW, A.; MANGOLD, K. A.; TAJUDDIN, M.; HUNTINGTON, A.; FRITZ, B.; THOMSON JR, R. B. & KAUL, K. L. Species-level identification of staphylococcal isolates by real-time pcr and melt curve analysis. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(6): 2876-2880, 2005.
- SMITH, J.L.; LIU, Y. & PAOLI, G.C. How does *Listeria monocytogenes* combat acid conditions? *Canadian Journal of Microbiology*, 59(1): 141–152, 2013.
- SOMMA, A. DI; MORETTA, A.; CANÈ, C.; CIRILLO, A. & DUILIO, A. Antimicrobial and antibiofilm peptides. *Biomolecules*, 10(652): 1-15, 2020.
- STEVENS, K. A., SHELDON, B. W., KLAPES, N. A. & KLAENHAMMER, T. R. Nisin treatment for inactivation of salmonella species and other gram-negative bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 57: 3613–3615, 1991.
- TAKHISTOV, P.; GEORGE, B. & CHIKINDAS, M. L. *Listeria monocytogenes*' step-like response to sub-lethal concentrations of nisin. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 1(): 159-162, 2009.
- TAYLOR, T.M.; GAYSINSKY, S.; DAVIDSON, P.M.; BRUCE, B.D. & WEISS, J. Characterization of antimicrobial-bearing liposomes by Zeta-potencial, vesicle size and encapsulation efficiency. *Food Biophysics*, 2: 1-9, 2007.
- TEIXEIRA, M.L.; SANTOS, J.; SILVEIRA, N.P. & BRANDELLI, A. Phospholipid nanovesicles containing a bacteriocin-like substance for control of *Listeria monocytogenes*. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 9: 49-53, 2008.
- TEMPLE, M.E. & NAHATA, M.C. Treatment of listeriosis. *Annals of Pharmacotherapy*, 34: 656-661, 2000.
- THERMO FISHER SCIENTIFIC. Ficha Técnica Platinum Taq DNA Polimerase. Disponível em: <<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/10966026>>. Acesso em: 16/03/2020.
- TORCHILIN, V.P. Recent advances with liposomes as pharmaceutical carrier. *Nature Reviews Drug Discovery*, 4: 145-160, 2005.

- TRABULSI, L. R. & ALTERTHUM, F. *Microbiologia*. 5a ed. São Paulo: Atheneu, 2008. cap. 29, p. 237-245.
- UNTERGASSER, A.; CUTCUTACHE, I.; KORESSAAR, T.; YE, T.; FAIRCLOTH, B.C.; REMM, M & ROZEN S.G. Primer 3 – new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Reserch*, 40(15): , 2012.
- VALLONE, P.M & BUTLER, J.M. AutoDimer: a screening tool for primer-dimer and hairpin structures. *BioTechniques*, 37(2): 226-231, 2004.
- VAN SCHAİK, W.; GAHAN, C.G.M. & HILL, C. Acid-adapted *Listeria monocytogenes* displays enhanced tolerance against the lantibiotics nisin and lacticin 3147. *Journal of Food Protection*, 62: 536-539, 1999.
- VANDESOMPELE, J.; PRETER, K. D; PATTYN, F.; POPPE, B; ROY, N. V.; PAEPE, A. D. & SPELEMAN, F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology*, 3(7): 1-12, 2002.
- VAUCHER, R.A.; GIONGO, J.L.; RECH, V.C.; SANTOS, R.C.V; LOPES, L.Q.S.; EBLING, M.; DELAMÉA, M.; SILVA, A.S. & BRANDELLI, A. Antimicrobial peptide P34 influences gene expression of *Listeria monocytogenes* growing in soft cheese. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 8(11): 235-239, 2016.
- VAUCHER, R.A.; GIONGO, J.L.; ESTIVALES, M.; RECH, V.C.; NISHIHIRA, V.S.K.; LUCHESE, C.; WILHELM, E.A.; BALDISSERA, M.D.; LOPES, L.Q.S.; SANTOS, R.C.V. & BRANDELLI, A. Influence of peptide P34 on gene expression of *Listeria monocytogenes* and *Listeria seeligeri*. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 9(1): 116-120, 2017.
- VÁZQUEZ-BOLAND, J.A.; KUHN, M.; BERCHE, P.; CHAKRABORTY, T.; DOMÍNGUEZ-BERNAL, G.; GOEBEL, W.; GONZÁLEZ-ZORN, B.; WEHLAND, J. & KREFT, J. *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. *Clinical Microbiology Reviews*, 14: 584-640, 2001.
- VEEN, S.V.D.; SCHALKWIJK, S.V.; MOLENAAR, D.; VOS, W.M.D.; ABEE, T. & WELLS-BENNIK, M. H. J. The SOS response of *Listeria monocytogenes* is involved in stress resistance and mutagenesis. *Microbiology*, 156: 374-384, 2010.

- VEGA, Y.; RAUCH, M.; BANFIELD, M.; ERMOLAEVA, E.; 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*, 52: 1553-1565, 2004.
- VERA, A.; GONZÁLEZ, G.; DOMÍNGUEZ, M. & BELLO, H. Main virulence factors of *Listeria monocytogenes* and its regulation. *Revista Chilena de Infectología*, 30: 407-416, 2013.
- VUOLO, J. H. *Fundamentos da teoria dos erros*. 2a ed. São Paulo: Edgard Blucher, 1996.
- WAGNER, A. & VORAUER-UHL, K. Liposome technology for industrial purposes. *Journal of Drug Delivery*, 59: 13-25, 2011.
- WATSON, J. D.; BAKER, T. A.; BELL, S. P.; GANN, A.; LEVINE, M.; LOSICK, R. & HARRISON, S. C. *Biología molecular do gene*. 7a ed. Porto Alegre: Artmed, 2015. cap. 10-11, pág. 314 à 361.
- WERBROUCK, H.; BOTTELDOORN, N.; UYTENDAELE, M.; HERMAN, L. & COILLIE, E.V. Quantification of gene expression of *Listeria monocytogenes* by real-time reverse transcription PCR: Optimization, evaluation and pitfalls. *Journal of Microbiological Methods*, 69(2): 306-314, 2007.
- WIEDEMANN, I.; BREUKINK, E.; KRAAIJ, C. V.; KUIPERS, O. P.; BIERBAUM, G.; KRUIJFF, B. & SAHL, H. G. Specific binding of nisin to the peptidoglycan precursor lipid II combines pore formation and inhibition of cell wall biosynthesis for potent antibiotic activity. *Journal of Biological Chemistry*, 276: 1772–1779, 2001.
- WINN, J.R.; WASHINGTON C.; et al. *Koneman diagnóstico microbiológico: texto e atlas colorido*. 6a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012. cap. 14, p. 760-767.
- WONG, M.L. & MEDRANO, J.F. Real-time PCR for mRNA quantitation. *BioTechniques*, 39(1): 1-11, 2005.
- ZAHA, A.; FERREIRA, H. B. & PASSAGLIA, L. M. P. *Biología molecular básica*. 4a ed. Porto Alegre: Artmed, 2012. cap.7-8, pág. 146-175

- ZUIDAM, N.J.; DE VRUEH, N. & CROMMELIN, D.J.A. *Characterization of liposomes. In: Torchilin V, Weissig W (eds) Liposomes: a Practical Approach.* New York: Oxford University Press, 2003. p 31-77.

**Apêndice I – Mortalidade geral no Brasil, categoria A32 da CID-10
(listeriose), período 2007-2016**

Óbitos p/Residênc por Ano do Óbito segundo Região/Unidade da Federação
Categoria CID-10: A32 Listeriose
Período: 2007-2016

Região/Unidade da Federação	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	Total
TOTAL	7	7	1	2	7	7	6	4	8	1	50
Região Norte	1	-	-	-	-	1	-	-	1	-	3
.. Rondônia	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
.. Acre	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
.. Amazonas	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
.. Roraima	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
.. Pará	1	-	-	-	-	1	-	-	1	-	3
.. Amapá	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
.. Tocantins	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Região Nordeste	-	1	1	-	1	2	1	-	1	-	7
.. Maranhão	-	-	-	-	1	2	-	-	-	-	3
.. Piauí	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
.. Ceará	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
.. Rio Grande do Norte	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
.. Paraíba	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
.. Pernambuco	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	1
.. Alagoas	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
.. Sergipe	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
.. Bahia	-	1	-	-	-	-	1	-	1	-	3
Região Sudeste	6	5	-	2	3	2	2	1	6	1	28
.. Minas Gerais	1	-	-	1	1	-	-	-	1	-	4
.. Espírito Santo	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
.. Rio de Janeiro	1	1	-	-	1	1	1	1	1	1	8
.. São Paulo	4	4	-	1	1	1	1	-	4	-	16
Região Sul	-	1	-	-	3	2	2	3	-	-	11
.. Paraná	-	-	-	-	2	-	-	-	-	-	2
.. Santa Catarina	-	1	-	-	-	1	1	1	-	-	4
.. Rio Grande do Sul	-	-	-	-	1	1	1	2	-	-	5
Região Centro-Oeste	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	1
.. Mato Grosso do Sul	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
.. Mato Grosso	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
.. Goiás	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
.. Distrito Federal	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	1
Ignorado/Exterior	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

**Tabela A-1.1 – Óbitos por listeriose no Brasil 2007-2016. Fonte: MINISTÉRIO DA SAÚDE
(2019)**

Apêndice II – Ferramentas para detecção e prevenção de produtos de amplificação indesejados

Conforme descrito no cap. 3.8.4, segundo o Real Time PCR Handbook (2016), o conceito envolvido na curva de *melting* é que cada sequência de nucleotídeos possui uma temperatura de *melting* específica. Baseando-se neste fato inclusive, já existem diversos trabalhos, como a título de exemplo SKOW et al. (2005), SINGH & MUSTAPHA (2014), NEJAD et al. (2020), utilizando a curva de dissociação como metodologia para diferenciar espécies ou linhagens de microrganismos com similaridade entre sequências muito elevada, situações em que por vezes, se torna impossível o atendimento a todos requisitos necessários ao projeto dos primers. Havendo disponibilidade para realização de uma curva de *melting* de alta resolução (que necessita de um termociclador com alta acurácia no controle da temperatura da reação, sensores ópticos e térmicos de alta sensibilidade e software de análise com aquisição de dados extremamente rápida, como por exemplo ABI 7500 Fast), é possível inclusive a identificação de SNPs, novas mutações e padrões de metilação.

Para a realização de um monitoramento consistente, conforme indicado pelo Real Time PCR Handbook (2016), é de fundamental importância que cada corrida contemple para cada conjunto primers/amostra, um controle negativo, constituído pelo mix de PCR sem a pipetagem da amostra. A constatação e identificação de produtos de amplificação indesejados é realizada através da interpretação dos resultados do amplification plot, curva de *melting* e eletroforese em gel, relativos à amostra em análise e seu respectivo controle negativo, conforme indicado na Tabela A-2.1.

Tabela A-2.1 – Interpretação conjunta dos resultados do amplification plot, curva de *melting* e eletroforese em gel, para detecção de amplificação de produtos indesejados. Fonte: O autor

	amplification plot	curva de melting	eletroforese em gel
A) Formação de dímeros de primers	presença de amplificação no controle negativo usual	presença de pico secundário à esquerda do pico principal	duas bandas no gel, sendo os pesos moleculares compatíveis com um amplicom e o dobro de um primer
B) Autodobramento	presença de amplificação no controle negativo usual	presença de pico secundário à esquerda do pico principal	duas bandas no gel, sendo os pesos moleculares compatíveis com um amplicom e um único primer
C) Amplificação de produtos inespecíficos	ausência de amplificação nos controles negativos	presença de pico secundário ou ruído e outras anomalias no pico principal	duas bandas no gel, sendo ambos pesos moleculares compatíveis com amplicons
D) Contaminação do mix de PCR com amostra	presença de amplificação no controle negativo usual	somente o pico principal	n/a

A título de exemplo, na Figura A-2.1 é apresentado o conjunto de resultados referentes a uma corrida de qPCR (12 poços). O amplification plot revela a presença de amplificação em 4 controles negativos, o que sugere 3 situações possíveis (formação de dímeros de primers, autodobramento ou contaminação do mix de PCR). Prosseguindo a análise, verifica-se na curva de *melting* que todos os controles negativos apresentam somente um pico secundário localizado à esquerda de onde estaria o pico principal (nos outros poços), sugerindo assim a possibilidade de 2 situações (formação de dímeros de primers ou autodobramento). Por outro lado, a ausência do pico principal nas curvas destes poços exclui a possibilidade de tratar-se de contaminação do mix de PCR. A formação de dímeros de primers ocorre mais facilmente no controle negativo, onde há uma abundância de primers e nenhum molde. De fato, observando a curva de *melting* dos demais 8 poços, observamos que há somente a presença do pico principal, não sendo identificado nenhum pico secundário, o

que sugere não ter ocorrido a formação de dímeros de primers ou autodobramento nestes poços. Esta interpretação também é confirmada pela eletroforese em gel, onde se visualiza somente uma banda principal nos demais 8 poços. Além disso, em 3 dos 4 controles negativos, se observa a presença de uma banda difusa situada abaixo de onde estaria a banda dos amplicons, com massa molecular compatível ao dobro dos primers o que portanto, é confirmatório da formação de dímeros de primers. Em um dos controles negativos usuais não foi constatada nenhuma banda na eletroforese em gel, uma vez que esta metodologia possui sensibilidade inferior ao qPCR, não detectando concentrações muito baixas. Uma vez que não há indícios da formação de dímeros de primers em nenhum dos 8 poços com amostras, os resultados da corrida da situação exemplificada seriam considerados válidos.

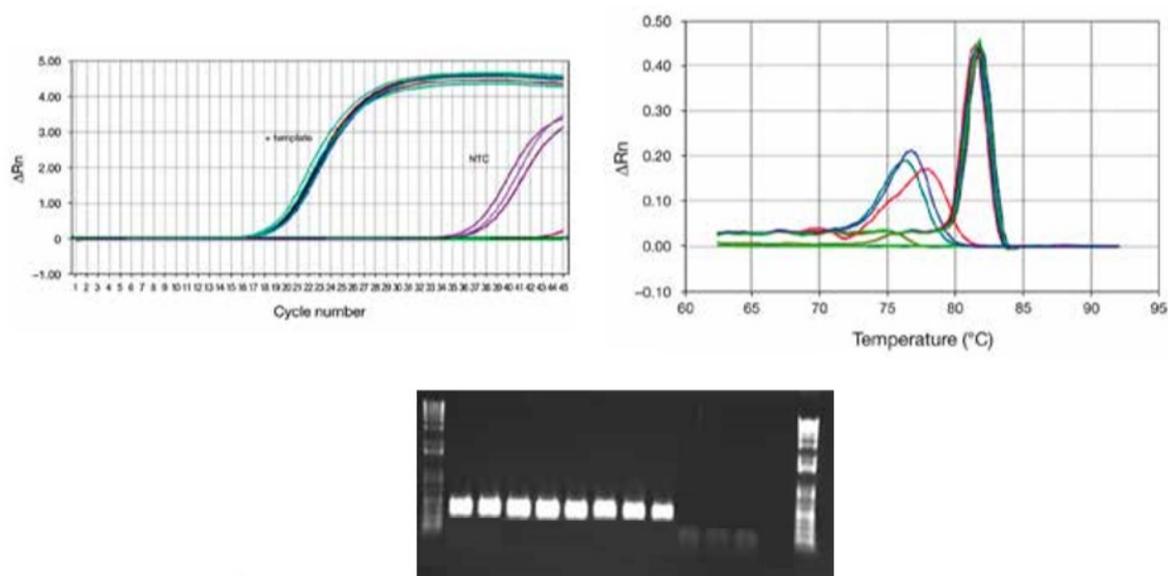


Figura A-2.1 – Exemplo de resultados indicando a formação de dímeros de primers ou autodobramentos. Fonte: Real Time PCR Handbook (2016)

Uma vez detectada a formação de dímeros de primers ou autodobramentos, nas reações de amplificação com amostra, devem ser adotadas progressivamente as seguintes medidas sugeridas no Real Time PCR Handbook (2016):

- A) Aumentar a temperatura de anelamento. Em muitas reações, o problema é resolvido simplesmente com este ajuste;
- B) Reduzir a concentração dos primers. Na maioria dos experimentos a concentração ideal é de 200 nM/primer. Porém, este valor pode ser reduzido até 60 nM se necessário. Também deve ser avaliado o uso de concentrações diferentes do primer *forward* e *reverse*;
- C) Manter a concentração de Mg²⁺ até 3 mM. Concentrações acima desta favorecem a formação de dímeros de primers.
- D) Reprojetar o conjunto de primers e sonda.

Embora os próprios bancos de dados biológicos contenham algoritmos robustos para verificar a especificidade de primers sequência-específicos, ainda ficam a desejar quanto à confiabilidade dos algoritmos para predição da formação de dímeros de primers. Uma excelente alternativa é a utilização do software PRIMER 3 Plus, versão 2.4.2. Apesar do copyright do software pertencer ao Whitehead Institute for Biomedical Research, conforme descrito pelos próprios autores, o desenvolvimento e atualização do software é realizado por um pequeno grupo de cientistas entusiastas, autofinanciados, em seu tempo livre. O software é gratuito e com código aberto, assim, além de utilizado por usuários finais para o projeto de seus primers, também pode ser utilizado por programadores que queiram incorporá-lo em seus próprios softwares.

Conforme descrito por UNTERGASSER et al. (2012), a partir da versão disponibilizada no mesmo ano, foram incorporados modelos termodinâmicos mais acurados para a predição da temperatura de *melting* entre primer e sua sequência alvo na fita simples de DNA, assim como contribuir através de uma escala arbitrária, para minimizar a formação de produtos inespecíficos de amplificação, dímeros de primers (primers diferentes ou idênticos) e autodobramentos.

Primer3Plus
pick primers from a DNA sequence

[More...](#) [Source Code](#)
[Help](#) [About](#)

< Back

Pair 1: Primer

Left Primer 1:
 Start: 63 Length: 22 bp Tm: 59.4 C GC: 45.5 % Any: 0.0 End: 0.0 TB: 0.0 HP: 36.4 3' Stab: 3.9 Penalty: 2.576

Right Primer 1:
 Start: 582 Length: 20 bp Tm: 59.6 C GC: 55.0 % Any: 0.0 End: 0.0 TB: 0.0 HP: 0.0 3' Stab: 4.0 Penalty: 0.392

Pair: Product Size: 520 bp Any: 0.0 End: 0.0 Penalty: 2.967

```

1      agttcaacag ctatgatcca aatcatatac ctgttaaggc taagattaat
51     gtcactgtaa ttggttcacg tgggaatagc cagatttcaa aagattatgg
101    ctgtgttgtt acctatccac tcagggtctg tgataactctt gcgaaaattg
151    cgaccaaagc tggctttgat gaagggttga tacaaaattt caatcaagat
201    gccaaattca gcataggaag tgggatagtg ttcattccag gaagagggtat
251    gtattttctc attttctgcc aactgtggtt gccacagatg gtttgaactt
301    ctgtcacatc cgttgtaact ttgataagtc tgaaaatccg cagttttagt
351    attactggta aattccatta taaatgttta atgtgatttg gtgattccta
401    tcaaaagtac ttgtataagt atgagagtta gataaaaaaa attatgacca
451    tctgtttctc gtggaatgg actctgataa ttcataaagt ctagecagtg
501    attgtaacaa ccaggcttgg aacttggtag tccaatcaa cttgaccttc
551    accgacctc attgaccact tgagtcgaac ctttaattt cagtttagagt
601    atatttaaat gctaagttac tctattattt tcaaaagtat atacatggta
651    taaatttga agttttatgt agttattgtt tactttgcag atcaaaatgg
701    acattttttt cttttgtatt ctaggtaagt aacattgatt atctcaattt
751    tcatttttga atgatttata gaagaagtaa atattgcttc atataatttg
801    gttatatttt tctaactttc attttctttt tatttttcca ttcttgacaga
851    acaggtttgt cttttg

```

Figura A-2.2 – Tela com dados de saída típicos do PRIMER 3 PLUS. Fonte: UNTERGASSER et al. (2012)

Particularmente o software reagrupa os problemas citados em duas categorias, hibridização bimolecular tipo END (pelas extremidades, seja entre primers, probes ou sequência inespecífica), hibridização bimolecular tipo ANY (central) e dobramento unimolecular (autodobrimento). A Figura A-2.2 demonstra uma tela com dados de saída típicos do programa.

Essa deficiência de análise se torna ainda maior quando há outros primers presentes na mesma reação, como no caso da reação de qPCR multiplex. Para tal finalidade, o Real Time PCR Handbook (2016), recomenda o uso do programa AUTODIMER versão 2017. O aplicativo foi originalmente desenvolvido pelo National Institute of Standards and Technology (NIST), vinculado ao departamento de comércio dos EUA, para auxiliar no projeto de primers de qPCR multiplex usados na análise de marcadores forenses, como as STRs (repetições curtas em tandem) e SNPs (polimorfismos de nucleotídeo único). Há uma versão disponível para download gratuito e outra para uso online. Particularmente nesta

última, a análise é limitada à inclusão de 100 primers com comprimento de até 75 nucleotídeos, o que é plenamente suficiente para a quase totalidade das situações. Já a versão para download permite a análise simultânea de até 1.000 sequências de nucleotídeos.

Conforme VALLONE & BUTLER (2004), para a análise de formação de dímeros de primers, o algoritmo utilizado no AUTODIMER testa duas a duas, todas as combinações possíveis entre as sequências cadastradas, incluindo cada primer combinado consigo mesmo. Para cada par formado, as sequências são incrementalmente sobrepostas, conforme representado na Figura A-2.3. Para cada possibilidade de alinhamento é gerado um score que é constituído pelo número de matches, subtraído o número de mismatches. Alinhamentos cujos scores sejam iguais ou superiores a um valor *threshold* definido pelo usuário, são apresentadas num relatório final, contendo uma representação gráfica do alinhamento, o valor do score, uma predição da temperatura de *melting* (T_m) e da variação da energia livre (ΔG). A Figura A-2.4 demonstra uma tela com dados de saída típicos do programa. Desta forma, dímeros de primers com temperaturas de dissociação inferiores à temperatura de anelamento (a qual constitui a menor temperatura envolvida no protocolo do termociclador), não representam nenhum problema, uma vez que nas temperaturas da reação já estarão dissociados.

Para a análise da formação de autodobramentos (ou grampos intramoleculares), é utilizada uma adaptação do mesmo algoritmo. Conforme VALLONE & BUTLER (2004), considerando que um grampo seja constituído por uma região de duas hastes com alguma complementaridade e uma região formada por uma alça ou loop, estudos têm demonstrado que os autodobramentos mais estáveis são aqueles constituídos por alças de 4 e 5 nucleotídeos. Assim, para cada primer cadastrado, é realizada a sobreposição incremental consigo mesmo, considerando hastes de no mínimo 2 nucleotídeos e alças formadas por 4 e 5 nucleotídeos. O algoritmo adaptado também pode ser melhor compreendido através da Figura A-2.3. A título de referência, dificilmente são encontrados problemas de formação de dímeros ou autodobramento, nas temperaturas da reação, em scores abaixo de 7 ou 8.

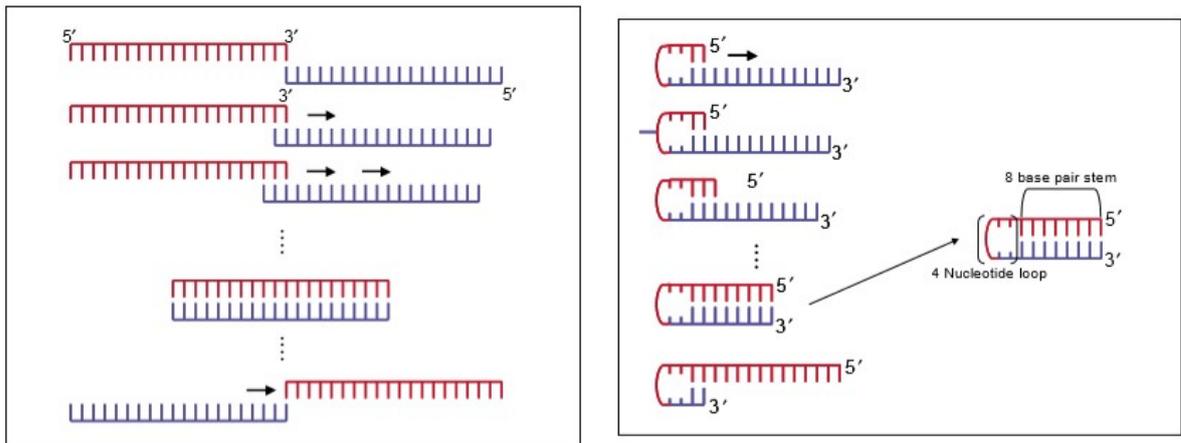


Figura A-2.3 – Representação do algoritmo de sobreposição incremental na análise de dímeros de primers (esquerda) e autodobramentos (direita). Fonte: VALLONE & BUTLER (2004)

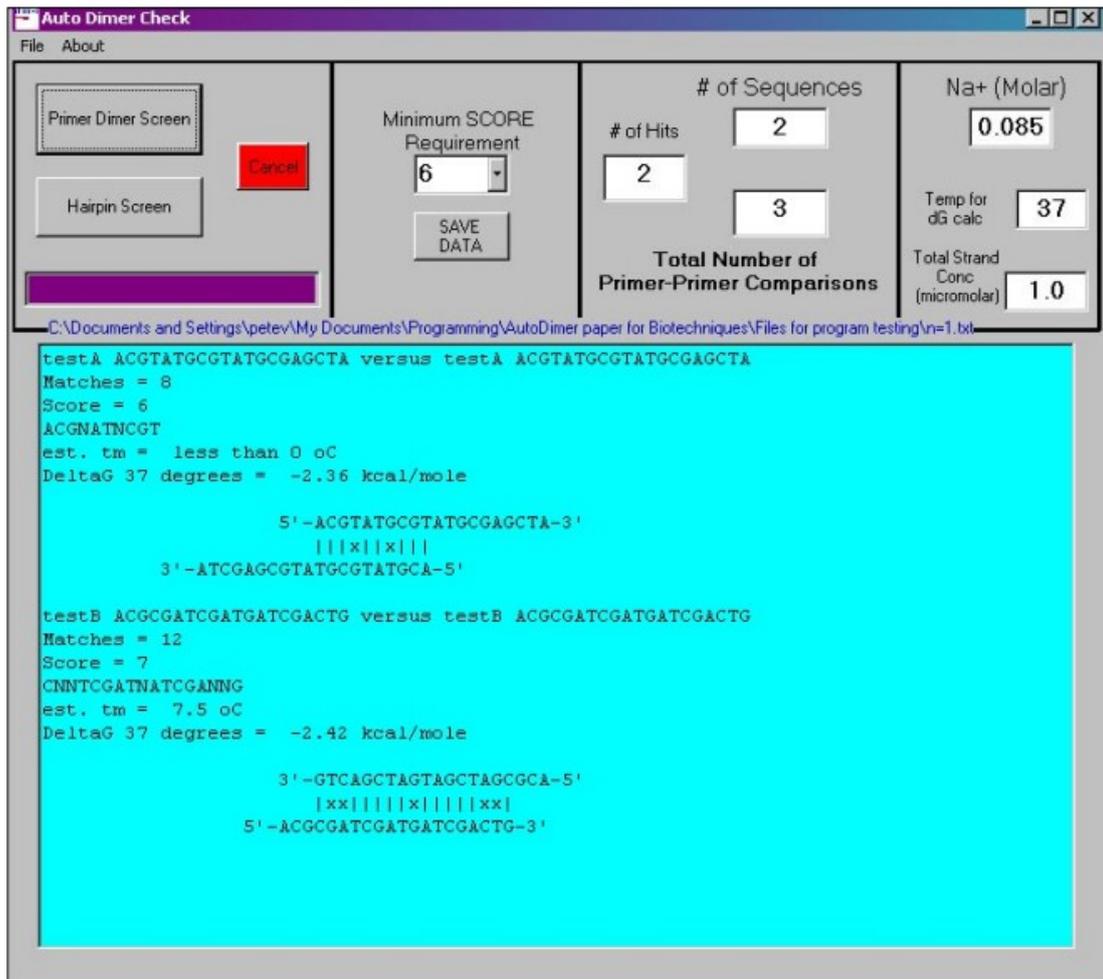


Figura A-2.4 – Tela com dados de saída típicos do AUTODIMER. Fonte: VALLONE & BUTLER (2004)

Ficam assim demonstradas as principais ferramentas disponíveis para a predição da formação de dímeros de primers ou autodobramentos, ainda durante a etapa de projeto dos primers, assim como as principais informações disponíveis para detecção da formação de produtos de amplificação indesejados, após realização da reação de PCR e as possíveis correções a serem realizadas, em caso de detecção.

Apêndice III – Análise dos principais algoritmos para normalização

A) Genorm

Conforme descrição no site oficial, GENORM é um algoritmo popular para determinação do gene de referência mais estável dentre um conjunto de genes candidatos. Desenvolvido em 2002, originalmente como uma aplicação em VBA para Microsoft Excel, Genorm foi incorporado em 2010 pela plataforma Qbase Plus, que oferece pacotes de acesso a ferramentas de análise para qPCR, passando a ser de acesso pago portanto. O algoritmo proposto por VANDESOMPELE et al. (2002), pode ser descrito de forma bastante sucinta da seguinte maneira:

Consideremos um conjunto de m amostras, para as quais o nível de expressão gênica a_n de n genes candidatos a reguladores foi determinado através da metodologia qPCR.

Para cada uma das amostras, foi calculada a razão R_{jk} entre os níveis de expressão de diferentes genes, combinados dois a dois (j e k), conforme Expressão A-3.1. Importante salientar, que fazendo isso, deixa-se de analisar o nível de expressão, que é suscetível a variações conforme o tamanho do input gênico, nível transcricional do tecido e eficiência de amplificação da corrida, por exemplo, para se analisar se a proporção entre o nível de expressão de dois genes é mantida entre as amostras.

$$R_{jk} = \frac{a_j}{a_k} \text{ Exp. A-3.1}$$

Para fins de melhor visualização dos resultados, é realizado uma redução de amplitude dos mesmos (achatamento), calculando-se o logaritmo na base 2 de cada razão R_{jk} , conforme Expressão A-3.2:

$$\log_2 R_{jk} = \log_2 \left(\frac{a_j}{a_k} \right) \text{ Exp. A-3.2}$$

A seguir é calculado o desvio padrão entre os logaritmos das razões R_{jk} relativas a todas as amostras, representado pela Expressão A-3.3. Evidentemente, para um normalizador ideal, todas as razões serão idênticas e portanto, o desvio padrão será nulo. Numa situação real, quanto mais próximo de zero o desvio padrão, maior a estabilidade.

$$\sigma(A_{jk}) = \sigma\left(\log_2\left(\frac{a_{j1}}{a_{k1}}\right), \log_2\left(\frac{a_{j2}}{a_{k2}}\right), \dots, \log_2\left(\frac{a_{jm}}{a_{km}}\right)\right) \text{ Exp. A-3.3}$$

Por fim, é calculada a média aritmética entre os desvios padrão obtidos para cada um dos (n-1) pares de genes formados com o gene de interesse j, demonstrado através da Expressão A-3.4, representando desta forma o quanto o gene j é estável não somente em relação ao gene k, mas a todos os genes que integram o pool da análise. Como visto, para um gene regulador ideal, todos os desvios padrão serão nulos e por consequência, a média aritmética deles também será e numa situação real, novamente, quanto mais próximo de zero a média M_j , maior a estabilidade.

$$M_j = \frac{\sum_{k=1}^{n-1} \sigma(A_{jk})}{n-1} \text{ Exp. A-3.4}$$

Supondo que nenhum dos genes seja co-regulado, a exclusão do gene com mais alto valor M_j da análise, demanda a atualização do valor M_j , de todos os genes remanescentes na análise, usualmente gerando valores menores a cada ciclo de exclusão/atualização. conforme exemplificado pela Figura A-3.1.

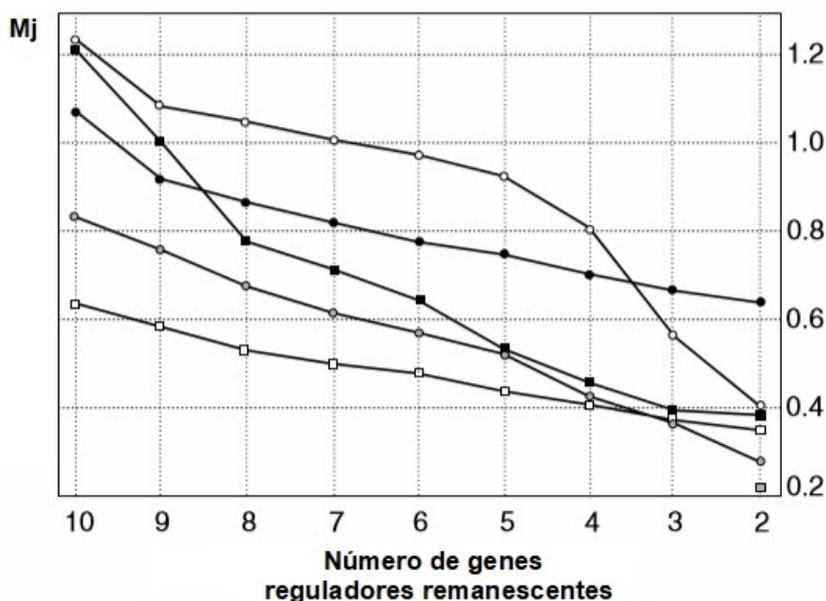


Figura A-3.1 – Aumento da estabilidade do gene candidato a regulador a cada ciclo de exclusão realizado. Fonte: VANDESOMPELE et al. (2002)

Para realização da normalização ou seja, a determinação do fator de normalização (FN), VANDESOMPELE et al. (2002), recomendam como parâmetro inicial, a utilização do nível de expressão gênica dos 3 genes mais estáveis, consolidados através de uma média geométrica ao invés de uma média aritmética, como forma de controlar melhor possíveis valores periféricos e diferenças nos níveis de expressão dos genes. Posteriormente deve ser testada a inclusão à média, de um novo gene candidato, para verificar se houve aumento da estabilidade. Essa verificação deve ser realizada considerando o normalizador calculado como se fosse um gene integrante do pool e rodando novamente o algoritmo. O procedimento deve ser repetido sucessivas vezes, até que a inclusão de um novo gene não produza mais nenhuma melhora significativa na estabilidade do normalizador.

B) NormFinder

Conforme descrição no site oficial, NORMFINDER é um algoritmo para identificação do gene normalizador ótimo, entre um conjunto de candidatos, considerando-se porém, a subdivisão das amostras em grupos. O algoritmo foi desenvolvido por pesquisadores do departamento de Medicina Molecular do

hospital universitário Aarhus, na Dinamarca em 2004 e está disponível para download gratuito em <https://moma.dk/normfinder-software>, na forma de uma aplicação VBA para Microsoft Excel. O trabalho de ANDERSEN et al. (2004), apresentam o desenvolvimento de uma modelagem estatística do problema, a qual pode ser resumidamente descrita da seguinte maneira:

Dada y_{igj} como sendo a medida log-transformada da expressão gênica do gene i , da amostra j , do grupo g , a mesma pode ser matricialmente escrita através de um Modelo Aditivo Generalizado (MAG), conforme indicado na Expressão A-3.5:

$$y_{igj} = \alpha_{ig} + \beta_{gj} + \varepsilon_{igj} \quad \text{Exp. A-3.5}$$

Onde, α_{ig} representa o nível de expressão geral do gene candidato i , dentro do grupo g , β_{gj} representa a quantidade total de mRNA da amostra j e ε_{igj} representa o erro associado à ocorrência de variações biológicas e fatores experimentais que afastam os resultados da linearidade, o qual possui média zero e variância σ_{ig}^2 . Embora α_{ig} e β_{gj} constituam valores característicos dos próprios resultados do experimento, uma vez que σ_{ig}^2 demanda o conhecimento dos valores verdadeiros dos níveis de expressão gênica para sua determinação e que estes valores não são conhecidos, o mesmo pode apenas ser estimado, através de s_{ig}^2 , o qual constitui um estimador não-enviesado. De forma geral, no modelo empregado, σ_{ig}^2 expressa a variação do nível de expressão gênica intragrupo e a variação de α_{ig} , a variação intergrupo.

Neste contexto, ANDERSEN et al. (2004) arbitram como medida da estabilidade de um gene i a Expressão A-3.6, na qual γ^2 constitui a variância de α_{ig} :

$$\rho_{ig} = \frac{\hat{\gamma}^2 |d_{ig}|}{\hat{\gamma}^2 + \hat{\sigma}_{ig}^2 / n_g} + \sqrt{\frac{\hat{\sigma}_{ig}^2 / n_g + \frac{\hat{\gamma}^2 \hat{\sigma}_{ig}^2 / n_g}{\hat{\gamma}^2 + \hat{\sigma}_{ig}^2 / n_g}}{\hat{\gamma}^2 + \hat{\sigma}_{ig}^2 / n_g}} \quad \text{Exp. A-3.6}$$

Como se observa, trata-se de um modelo estatístico sofisticado, de difícil compreensão para não-estatísticos, afastando-se de uma abordagem simplista e intuitiva, de maneira que não foi possível realizar a completa validação da dedução apresentada no material suplementar do trabalho de ANDERSEN et al. (2004). Porém, deve-se ressaltar que em seu trabalho, foram comparados os resultados do algoritmo proposto (“abordagem baseada em modelo”) com os resultados do algoritmo desenvolvido no trabalho de VANDESOMPELE et al. (2002), (“abordagem de comparação pareada”), para genes candidatos a normalizadores em amostras de câncer de intestino e bexiga, demonstrando resultados embora divergentes, com algum grau de semelhança entre posições adjacentes, como se observa na Tabela A-2.2, onde os candidatos são listados em ordem decrescente de estabilidade.

Tabela A-3.1 – Comparação dos resultados obtidos pelos algoritmos. Fonte: ANDERSEN et al. (2004)

Intestino		Bexiga	
"Baseada em modelo"	"Comparação pareada"	"Baseada em modelo"	"Comparação pareada"
UBC	RPS23 E TPT1	HSPCB	CFL1 E UBC
GAPD		TEGT	
TPT1	RPS13	ATP5B	ATP5B
UBB	SUI1	UBC	HSPCB
TUBA6	UBC	RPS23	GAPD
RPS13	GAPD	RPS13	TEGT
NACA	TUBA6	CFL1	RPS23
CFL1	UBB	FLJ20030	RPS13
SUI1	NACA	TPT1	TPT1
ACTB	CFL1	UBB	FLJ20030
CLTC	CLTC	FLOT2	FLOT2
RPS23	ACTB	GAPD	UBB
FLJ20030A	FLJ20030A	S100A6	ACTB
		ACTB	S100A6

C) BestKeeper

Conforme descrição no site oficial, BESTKEEPER é um algoritmo para determinação de genes reguladores estáveis, genes de interesse diferencialmente regulados e integridade da amostra. O algoritmo que adota uma abordagem de “correlação pareada”, foi proposto por PFAFFL et al. (2004) e está disponível para download gratuito em <https://www.gene->

quantification.de/bestkeeper.html#download., na forma de uma aplicação VBA para Microsoft Excel, podendo ser descrito essencialmente da seguinte maneira:

Consideremos novamente um conjunto de m amostras e n genes. Inicialmente os genes devem ser segregados em dois subgrupos, o primeiro constituído pelos genes candidatos a reguladores e o segundo pelos genes de interesse. Para cada um dos genes candidatos a reguladores, é calculado o desvio padrão dos valores de C_p entre todas as amostras disponíveis. O algoritmo elaborado por PFAFFL et al. (2004), carrega um conceito que quanto mais próximo de zero o desvio padrão, maior a estabilidade do gene. Assim, genes candidatos que apresentem desvio padrão elevado (igual ou superior a 1,0 ciclo) são considerados inadequados e desconsiderados da análise.

A seguir, para cada uma das amostras é calculada uma variável denominada Índice BestKeeper, o qual consiste na média geométrica dos valores de C_p , dos genes que demonstraram estabilidade adequada, na forma como esta foi definida acima, conforme representado pela Expressão A-3.7, onde z é o total de genes candidatos a reguladores que permaneceram na análise.

$$\text{ÍndiceBestKeeper} = \sqrt[z]{C_{p1} \times C_{p2} \times \dots \times C_{pz}} \quad \text{Exp. A-3.7}$$

Por fim, os genes candidatos remanescentes são pareados dois a dois e utilizando os valores de C_p obtidos em cada uma das amostras, são determinados o coeficiente de correlação de Pearson, o coeficiente de determinação e o valor-P estatístico. Cada um dos genes também é pareado com o Índice BestKeeper e os mesmos valores são igualmente determinados. O gene candidato que demonstre um coeficiente de determinação fraco (inferior a 0,9) em relação ao índice de BestKeeper, é excluído da análise, o índice é recalculado e a análise repetida até que todos coeficientes apresentem valor adequado.

Um primeiro ponto de discordância em relação ao algoritmo é a necessidade de serem indicados quais genes dentre o pool, são os candidatos a gene reguladores, fato que caracteriza um juízo prévio do pesquisador sobre o que deve ser tomado como referência.

O segundo ponto consiste que atribuir a estabilidade do gene a um menor desvio padrão dos valores de C_p entre as amostras constitui um erro. Pois o valor de C_p , reflete a abundância do gene na amostra. Como já mencionado, uma amostra proveniente das mesmas condições experimentais que outra, porém, diferindo apenas por ter um input gênico maior, espera-se que apresente uma abundância também maior. E essa variação não configura falta de estabilidade, mas sim reflete o fator de normalização desejado. Desta forma, a estabilidade da abundância do gene na amostra, não pode ser tomada como sinônimo de estabilidade do nível de expressão.

Por fim, os coeficientes de correlação/determinação acabam por serem utilizados para selecionar os genes que estejam alinhados a uma tendência predominante, segregando os demais da composição do índice. Porém, adversamente, se reconhecermos que o gene normalizador ideal inexistia, muitas vezes se torna necessária a combinação de genes que demonstrem tendências opostas para a obtenção de um fator de normalização mais próximo do ideal.

Apêndice IV – Utilização de curvas padrão para determinação da eficiência de amplificação

Segundo o Real Time PCR Handbook (2016), a curva padrão é produzida a partir da diluição seriada de uma amostra com concentração conhecida do DNA/cDNA de interesse. Cada uma das concentrações utilizadas (eixo x) é plotada contra o respectivo valor de Ct obtido na reação de PCR (eixo y). Importante ressaltar que para construção da curva, devem ser utilizadas concentrações que ultrapassem a faixa de valores a serem analisados no experimento. Um exemplo de curva padrão pode ser visualizado na Figura A-4.1.

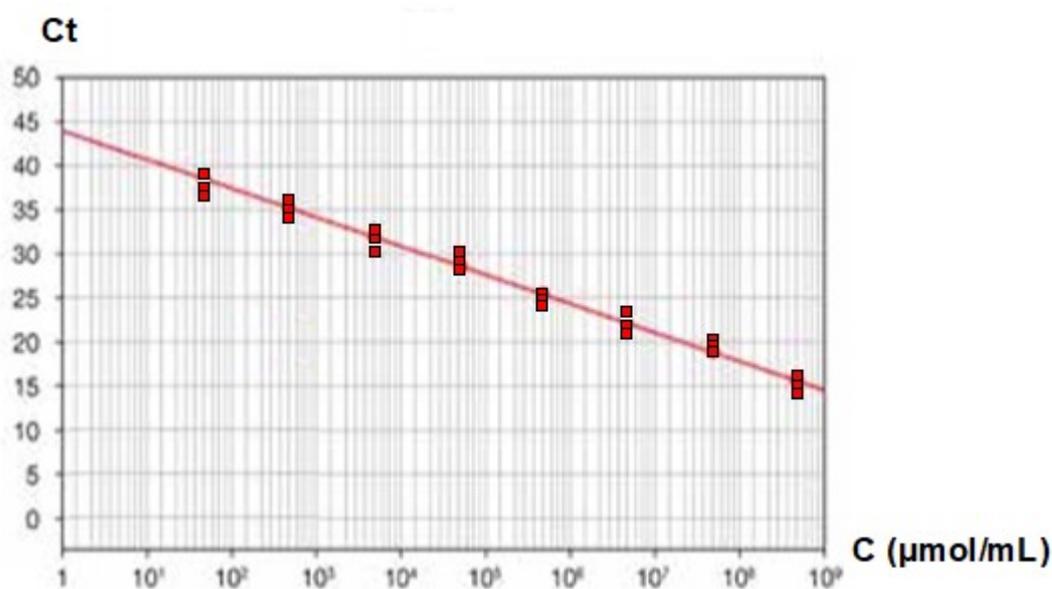


Figura A-4.1 – Exemplo de curva padrão da reação de qPCR. Fonte: Adaptado de Real Time PCR Handbook (2016)

Ainda segundo o Real Time PCR Handbook (2016), além da eficiência de amplificação da reação de PCR, diversas outras informações também podem ser extraídas da curva padrão, tais como os limites de linearidade da reação de PCR, ou seja, as concentrações para as quais a eficiência de amplificação permanece constante, o limite de detecção (concentração para a qual se obtém Ct igual a 40), a interseção com o eixo y (y-intercept), que mesmo muitas vezes sendo uma situação indetectável, caracteriza a sensibilidade do sistema de PCR e pode ser utilizado para comparar diferentes sistemas e alvos e ainda o coeficiente de

correlação da regressão linear, que nos permite mensurar a dispersão de valores intra e extra-replicatas observados.

Um possível caminho para a obtenção de uma amostra com concentração conhecida e confiável do cDNA de interesse, conforme exemplifica PEIRSON et al. (2003), consiste na utilização de primers sequência-específicos para realização da transcrição reversa, amplificação da sequência desejada utilizando a própria reação de PCR, verificação se não houve a formação de produtos indesejados através dos amplification plots e curvas de *melting*, purificação dos produtos obtidos através de cromatografia líquida clássica em coluna, permitindo assim a extração da fração desejada, retirada de alíquotas desta fração para confirmação do amplicom projetado através de sequenciamento de DNA e por fim, a quantificação através de espectrometria de massas, configurando portanto, protocolo bastante extenso.

Uma vez obtida a curva padrão, conforme o Real Time PCR Handbook (2016), a eficiência de amplificação é calculada a partir do coeficiente angular (slope) da reta obtida, utilizando-se a Expressão A-4.1:

$$E_x = 10^{\left(\frac{-1}{slope}\right)} - 1 \quad \text{Exp A-4.1}$$

Apêndice V – Dedução das expressões para determinação do nível de expressão gênica relativa

Conforme descrito no cap. 3.8.7, a dedução das expressões acima referenciadas podem ser realizadas a partir da Expressão 23, a qual para maior conveniência é reproduzida a seguir, sendo denotada como Expressão A-5.1.

$$\frac{X_{0N,Q}}{X_{0N,C}} = \frac{\frac{X_{T,Q} \cdot (1 + E_{X,Q})^{-C_{T,X,Q}}}{R_{T,Q} \cdot (1 + E_{R,Q})^{-C_{T,R,Q}}}}{\frac{X_{T,C} \cdot (1 + E_{X,C})^{-C_{T,X,C}}}{R_{T,C} \cdot (1 + E_{R,C})^{-C_{T,R,C}}}} \quad \text{Exp. A-5.1}$$

Sendo possível utilizar para cada gene o mesmo valor de *threshold* na situação questionada e na situação calibradora, resulta que $X_{T,Q} = X_{T,C}$. O mesmo raciocínio também é válido para os genes de referência, resultando assim que $R_{T,Q} = R_{T,C}$. Necessário ressaltar que mesmo que os valores de *threshold* adotados para cada gene não sejam idênticos, pode-se de igual maneira reescrever a Expressão A-5.1 conforme indicado na Expressão A-5.2:

$$\frac{X_{0N,Q}}{X_{0N,C}} = \frac{\frac{(1 + E_{X,Q})^{-C_{T,X,Q}}}{(1 + E_{R,Q})^{-C_{T,R,Q}}}}{\frac{(1 + E_{X,C})^{-C_{T,X,C}}}{(1 + E_{R,C})^{-C_{T,R,C}}}} \quad \text{Exp. A-5.2}$$

Supondo eficiências de amplificação iguais entre gene de interesse e gene de referência ou seja $E_X = E_R = E$, podemos reescrever a Expressão A-5.2 da forma apresentada na Expressão A-5.3, que é a expressão apresentada no trabalho de LIU & SAINT (2002):

$$\frac{X_{0N,Q}}{X_{0N,C}} = \frac{\frac{(1+E)^{-C_{T,X,Q}}}{(1+E)^{-C_{T,R,Q}}}}{\frac{(1+E)^{-C_{T,X,C}}}{(1+E)^{-C_{T,R,C}}}} = \frac{(1+E)^{-(C_{T,X,Q}-C_{T,R,Q})}}{(1+E)^{-(C_{T,X,C}-C_{T,R,C})}} = \frac{(1+E)^{-\Delta C_{T,Q}}}{(1+E)^{-\Delta C_{T,C}}} = (1+E)^{-\Delta C_{T,Q}-\Delta C_{T,C}} = (1+E)^{-\Delta \Delta C_T}$$

Exp. A-5.3

Por fim, supondo-se uma eficiência de amplificação de 100%, chega-se à Expressão A-5.4, que consiste na expressão clássica apresentada no trabalho de LIVAK & SCHMITTGEN (2001):

$$\frac{X_{0N,Q}}{X_{0N,C}} = 2^{-\Delta \Delta C_T} \quad \text{Exp. A-5.4}$$

Porém, há que ser observado, que a utilização da Expressão A-5.4 restringe-se às situações que assegurem as duas premissas utilizadas na dedução da referida expressão, ou seja, que a eficiência de amplificação do gene de interesse e do gene de referência sejam aproximadamente iguais a 100%. Sendo as eficiências de amplificação envolvidas, diferentes de 100%, porém, todas possuindo o mesmo valor, é possível ainda a utilização da Expressão A-5.3.

Para outras situações, a partir da Expressão A-5.2, resolvendo-se a divisão de 2 frações, os expoentes negativos e reorganizando-se a multiplicação de denominadores, obtêm-se a Expressão A-5.5, que consiste na expressão apresentada no trabalho de PFAFFL (2001):

$$\frac{X_{0N,Q}}{X_{0N,C}} = \frac{\frac{(1+E_{X,Q})^{-C_{T,X,Q}}}{(1+E_{R,Q})^{-C_{T,R,Q}}}}{\frac{(1+E_{X,C})^{-C_{T,X,C}}}{(1+E_{R,C})^{-C_{T,R,C}}}} = \frac{(1+E_{X,Q})^{-C_{T,X,Q}}}{(1+E_{R,Q})^{-C_{T,R,Q}}} \cdot \frac{(1+E_{R,C})^{-C_{T,R,C}}}{(1+E_{X,C})^{-C_{T,X,C}}} = \frac{(1+E_{R,Q})^{C_{T,R,Q}}}{(1+E_{X,Q})^{C_{T,X,Q}}} \cdot \frac{(1+E_{X,C})^{C_{T,X,C}}}{(1+E_{R,C})^{C_{T,R,C}}} = \frac{(1+E_{R,Q})^{C_{T,R,Q}}}{(1+E_{R,C})^{C_{T,R,C}}} \cdot \frac{(1+E_{X,C})^{C_{T,X,C}}}{(1+E_{X,Q})^{C_{T,X,Q}}} \quad \text{Exp. A-5.5}$$

Supondo as eficiências de amplificação na situação questionada e situação calibradora idênticas, para cada um dos genes, pode-se simplificar a Expressão A-5.5 conforme demonstrado na Expressão A-5.6, que consiste na expressão deduzida pela Roche Applied Science, em sua nota técnica LC 13/2001, para aplicação em reações de qPCR com eficiências de amplificação diferentes de 100% e distintas entre os genes:

$$\frac{X_{0N,Q}}{X_{0N,C}} = \frac{(1 + E_X)^{C_{T,X,C}} \cdot (1 + E_R)^{C_{T,R,Q}}}{(1 + E_X)^{C_{T,X,Q}} \cdot (1 + E_R)^{C_{T,R,C}}} = (1 + E_X)^{(C_{T,X,C} - C_{T,X,Q})} \cdot (1 + E_R)^{(C_{T,R,Q} - C_{T,R,C})} \quad \text{Exp. A-5.6}$$

Porém, a Expressão A-5.6 possui o inconveniente de não ser aplicável a uma ampla gama de experimentos, nos quais as eficiências de amplificação calculadas para a situação questionada e situação calibradora apresentam valores distintos, ficando restrito nestes casos ao uso da Expressão A-5.5. Por sua vez, a Expressão A-5.5 também possui o inconveniente de não ser aplicável aos casos em que não seja possível estabelecer valores de *threshold* idênticos para situação questionada e situação calibradora, ficando então estes casos restritos ao uso da Expressão Geral para Determinação do Nível de Expressão Gênica Relativa, denotada pela Expressão A-5.1.

Apêndice VI – Fotos do filme lipídico obtido e cultivos realizados nos ensaios de eficiência de encapsulação



Figura A-6.1 – Aspecto do filme lipídico obtido. Fonte: O autor

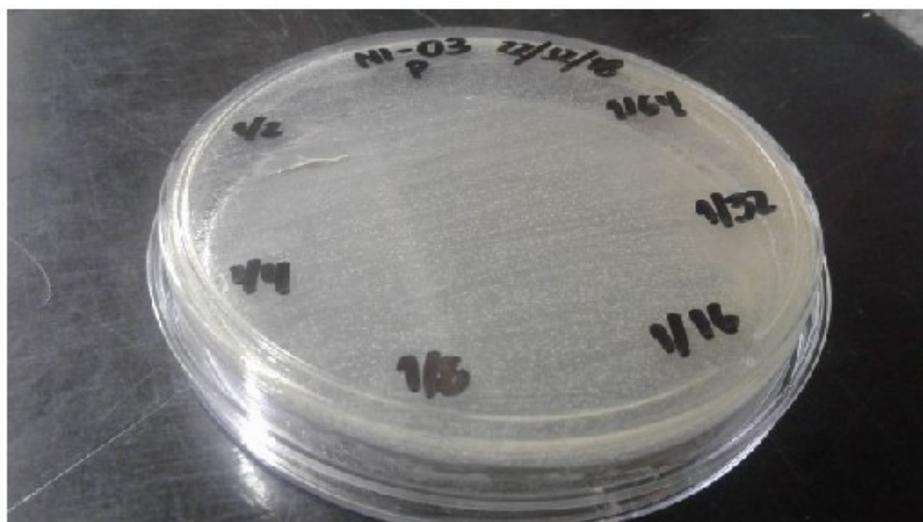


Figura A-6.2 – Aspecto da placa Ni-03 após 24 h de cultivo em estufa a 37 °C. Fonte: O autor

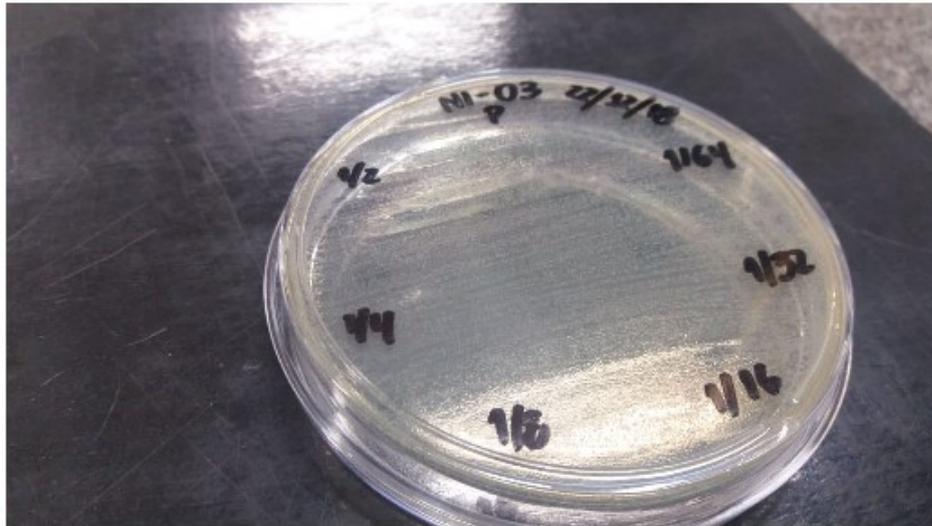


Figura A-6.3 – Aspecto da placa Ni-03 após 48 h de cultivo em estufa a 37 °C. Fonte: O autor

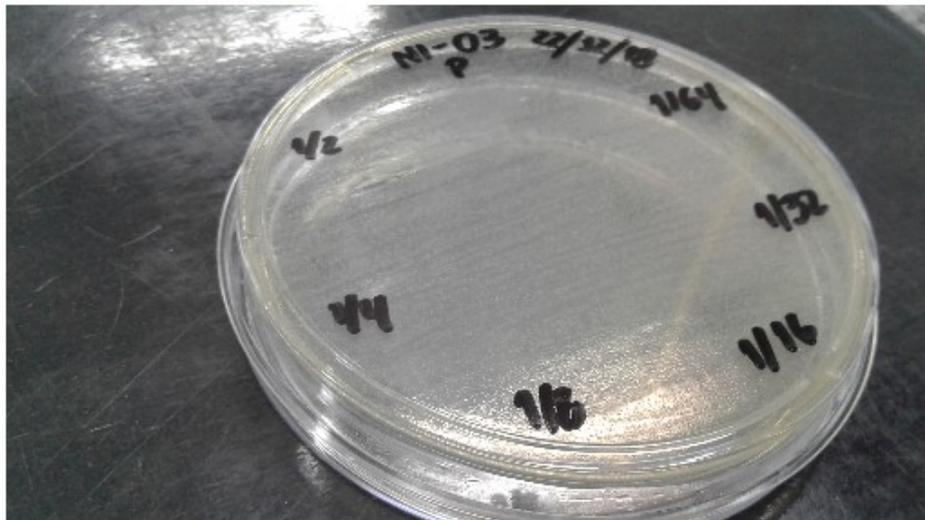


Figura A-6.4 – Aspecto da placa Ni-03 após 72 h de cultivo em estufa a 37 °C. Fonte: O autor

Apêndice VII – Médias dos valores de Ct entre replicatas técnicas

Amostra	<i>prfA</i>	<i>sigB</i>	<i>ctsR</i>	<i>lexA</i>	<i>dnaA</i>	<i>virR</i>	<i>kat</i>	<i>1433</i>	<i>rpoD</i>	<i>rpsL</i>	<i>infA</i>
21X1	22,26	21,21	21,56	22,91	22,00	22,86	21,85	22,02	22,36	21,69	22,40
22X1	23,01	19,32	19,22	-	20,20	-	22,79	22,65	23,06	23,09	21,69
23X1	21,81	20,03	19,67	22,20	19,96	22,86	21,40	21,88	22,01	21,46	21,91
21X5	23,72	22,97	22,58	24,38	23,24	25,54	23,97	24,07	24,32	23,81	25,10
21X2	24,40	23,18	23,70	25,44	-	25,99	24,24	24,47	24,33	24,29	-
22X2	23,78	20,61	20,62	-	21,05	24,77	23,41	23,67	23,45	23,64	22,82
23X2	22,31	20,06	19,87	23,19	20,61	23,82	22,28	22,59	22,66	22,12	22,20
22X5	24,87	23,73	23,44	25,90	23,80	25,25	24,74	24,90	24,93	24,63	25,65
21X3	22,15	20,54	20,59	22,92	21,08	24,00	22,03	22,56	22,64	22,07	22,03
22X3	20,98	19,63	20,03	21,72	20,84	22,59	21,25	21,44	21,64	21,34	21,16
23X3	23,57	19,05	19,11	22,56	19,58	-	23,39	23,37	23,33	22,96	21,18
23X5	21,89	19,94	-	22,94	20,12	23,72	22,77	22,58	23,05	22,16	22,51
21X4	21,75	21,03	20,49	22,85	21,06	23,44	22,45	22,31	22,49	21,63	22,63
22X4	19,94	19,78	19,29	21,06	20,23	21,24	20,35	20,16	20,66	19,91	20,00
23X4	22,68	-	20,02	23,15	20,07	24,41	22,90	22,95	23,17	22,32	22,03
24X1	23,36	22,93	23,95	24,02	23,42	24,92	22,74	23,43	23,78	23,24	24,74
25X1	25,49	-	23,82	25,91	24,94	26,27	24,61	25,09	25,44	24,94	25,44
26X1	22,23	21,50	21,45	22,67	22,03	23,56	22,11	22,10	22,59	22,38	22,99
24X5	25,87	-	25,61	26,07	25,53	27,01	25,61	25,53	26,19	25,57	27,13
24X2	20,28	19,79	-	20,87	20,20	22,13	20,46	19,94	20,58	20,19	21,19
25X2	24,18	23,12	23,55	24,78	23,78	25,25	23,80	23,92	24,23	23,89	24,12
26X2	23,98	23,03	22,89	24,30	24,06	24,46	23,41	23,45	24,10	23,52	23,85
25X5	19,06	18,41	18,44	19,56	19,21	20,27	19,11	19,44	19,66	17,92	19,36
24X3	24,13	23,40	23,84	24,71	23,86	25,00	23,90	23,97	24,72	23,88	24,96
25X3	25,99	-	24,99	27,01	25,16	25,89	25,22	25,52	25,62	25,52	25,40
26X3	20,19	20,27	20,59	20,87	20,54	21,43	20,38	20,48	21,11	20,17	21,34
26X5	21,70	21,54	22,20	21,71	21,72	23,10	21,87	21,80	22,43	21,72	23,69
24X4	25,41	-	24,94	25,99	24,88	26,82	24,93	25,53	-	25,20	26,28
25X4	25,33	24,24	24,19	26,18	24,21	26,63	24,27	24,89	24,81	24,33	25,02
26X4	23,79	22,80	22,68	24,71	23,39	24,73	23,35	23,67	23,98	23,62	23,72
31X1	24,23	-	25,08	25,36	23,30	23,96	23,76	25,16	25,33	24,49	26,04
32X1	22,66	-	23,29	24,23	22,24	-	23,04	23,62	24,02	22,97	25,02
33X1	24,82	-	24,61	25,90	24,09	24,24	24,87	25,11	25,32	24,73	26,91
31X3	21,94	-	23,17	23,41	21,48	22,33	22,28	22,83	23,39	22,25	24,15
32X3	19,99	-	20,79	21,38	19,49	20,55	20,02	20,94	21,09	20,28	22,08
33X3	23,66	-	23,94	25,14	23,02	24,07	23,68	24,70	24,52	24,05	26,16
31X4	24,71	-	24,37	26,21	24,04	24,27	23,45	25,75	25,57	24,99	26,78
32X4	19,63	-	20,43	20,75	19,31	20,08	19,65	20,25	20,21	19,74	21,44
33X4	21,17	-	21,72	22,59	20,88	21,39	21,65	22,20	22,55	21,79	23,97
31X5	24,06	-	24,49	25,59	23,55	24,11	23,72	24,82	24,91	24,35	26,34
32X5	20,63	-	21,73	21,97	20,35	21,18	20,86	21,66	21,76	21,26	22,97
33X5	19,83	-	20,89	20,98	19,72	20,40	20,33	20,30	20,46	19,94	22,35
41X1	24,24	-	22,67	25,38	22,58	24,16	24,32	24,71	25,14	24,18	26,36
42X1	25,33	-	22,63	26,85	23,06	25,14	25,68	26,33	26,36	25,62	26,99
43X1	25,86	-	23,28	27,31	23,89	24,79	26,17	26,75	27,02	26,03	28,15
41X3	28,07	-	22,80	29,34	23,73	26,98	28,30	29,44	30,11	29,27	28,09
42X3	27,08	-	21,98	28,08	22,87	25,76	26,97	28,00	28,46	28,06	26,69
43X3	28,06	-	-	28,68	-	26,19	28,25	29,13	30,78	30,49	27,47
41X4	25,17	-	19,41	24,40	19,71	22,30	23,16	25,97	26,29	26,25	23,55
42X4	28,28	-	22,80	29,79	22,98	26,60	29,57	30,12	30,57	29,59	30,08
43X4	29,73	-	24,42	32,00	25,25	28,37	31,50	31,31	33,02	30,67	33,20
41X5	23,88	-	23,38	24,66	22,34	23,27	23,36	23,95	24,43	23,17	25,65
42X5	27,91	-	26,56	29,17	25,89	27,20	-	29,05	29,17	27,80	30,02
43X5	30,57	-	31,14	31,41	29,73	-	31,68	31,70	33,54	30,93	34,03

Tabela A-7.1 – Médias dos valores de Ct entre replicatas técnicas. Fonte: O autor

Apêndice VIII – Rotina computacional elaborada para análise gráfica e regressão não linear sigmoidal

```
Public lyn As Integer
Public Ma As Double
Public Mb As Double
Public Mbxbest As Double
Public Mc As Double
Public Msoma As Double
```

```
Public Sub calculador_eficiencias()
```

```
Dim tipo As Integer
```

```
Sheets("analizador").Select
Range("AD9:AL52").Select
Selection.ClearContents
lyn = 9
```

```
Sheets("prfA2").Select
tipo = Cells(7, 6)
Range("F9:F3848").Select
Selection.Copy
Sheets("analizador").Select
Range("C9").Select
ActiveSheet.Paste
Selection.PasteSpecial Paste:=xlPasteValues, Operation:=xlNone, SkipBlanks _
:=False, Transpose:=False
Cells(6, 8) = tipo
Sheets("flags").Select
Range("B2:B97").Select
Selection.Copy
Sheets("analizador").Select
Range("Y9").Select
ActiveSheet.Paste
distribui_flags
plota_replicatas
```

End Sub

Public Sub distribui_flags()

Dim linha As Integer

Dim line As Integer

Sheets("analizador").Select

linha = 9

line = 9

While Cells(line, 24) <> 0

contador = 1

While contador <= 40

If contador = 40 Then

Cells(linha, 4) = Cells(line, 25)

End If

linha = linha + 1

contador = contador + 1

Wend

line = line + 1

Wend

End Sub

Public Sub plota_replicatas()

Dim linha As Integer

Dim line As Integer

Dim cont As Integer

Dim repl As Integer

Sheets("analizador").Select

Range("I9:I968").Select

Selection.ClearContents

```

linha = 29
While linha <= 3848
    line = 9
    cont = 1
    repl = 1
    While line <= 968
        Cells(line, 9) = Cells(linha, 3)
        line = line + 1
        If cont = 20 Then
            If repl <= 24 Then
                Cells(2 + repl, 17) = Cells(linha, 4)
            Else
                Cells(2 + repl - 24, 20) = Cells(linha, 4)
            End If
            linha = linha + 21
            cont = 1
            repl = repl + 1
        Else
            linha = linha + 1
            cont = cont + 1
        End If
    Wend
    Cells(2, 16) = Cells(lyn, 27)
    UserForm1.Show
    lyn = lyn + 1
Wend

End Sub

```

```

Private Sub CommandButton3_Click()

```

```

Dim a As Double
Dim b As Double
Dim c As Double
Dim aestimado As Double
Dim bestimado As Double
Dim cestimado As Double
Dim soma As Double

```

Dim x As Double
Dim y As Double
Dim ycalc As Double
Dim Erro As Double
Dim linha As Integer
Dim line As Integer
Dim flag As Integer
Dim contador As Integer

Range("N9:N28").Select
Selection.ClearContents

'modulo 1
linha = 28
flag = 1
While linha <= 968 And flag = 1
 line = linha
 While Cells(line, 13) < 0.1 And line > linha - 19
 line = line - 1
 Wend
 If Cells(line, 13) >= 0.1 Then
 flag = 0
 End If
 linha = linha + 20
Wend
If Cells(line, 13) < 0.1 Then
 y = 0
 x = 0
Else
 y = Cells(line, 13)
 x = Cells(line, 12)
End If

'modulo 2
Ma = 0
Mb = 0
Mbxbest = 0
Mc = 0
Msoma = 1000

```

a = 0.7
While a <= 1.2
  c = 0.6
  While c <= 1.1
    bestimado = -(1 / (y / a - 1) + 1) / (Exp(-c * x))
    b = 0.8
    While b <= 1.25
      soma = 0
      linha = 9
      While linha <= 968
        If Cells(linha, 13) <> 0 Then
          ycalc = a * (-1 / (1 + b * bestimado * Exp(-c * Cells(linha, 12))) + 1)
          Erro = (Cells(linha, 13) - ycalc) ^ 2
          soma = soma + Erro
        End If
        linha = linha + 1
      Wend
      If soma < Msoma Then
        Ma = a
        Mb = b
        Mbxbest = b * bestimado
        Mc = c
        Msoma = soma
      End If
      b = b + 0.001
    Wend
    c = c + 0.1
  Wend
  a = a + 0.01
Wend

```

```

'módulo 3
Cells(2, 13) = Ma
Cells(3, 13) = Mb
Cells(4, 13) = Mbxbest
Cells(5, 13) = Mc
Cells(6, 13) = Msoma

```

```
'modulo 4
linha = 9
While linha <= 28
    Cells(linha, 14) = Ma * (-1 / (1 + Mbxbest * Exp(-Mc * Cells(linha, 12))) + 1)
    linha = linha + 1
Wend
ActiveSheet.ChartObjects("Gráfico 2").Activate
ActiveWindow.Visible = False

End Sub
```

```
Private Sub CommandButton4_Click()
```

```
Dim cont As Integer
```

```
Cells(lyn, 30) = Ma
Cells(lyn, 31) = Mb
Cells(lyn, 32) = Mbxbest
Cells(lyn, 33) = Mc
Cells(lyn, 34) = Msoma
ActiveWorkbook.Save
Unload UserForm1
```

Apêndice IX – Eficiências de amplificação

Amostras		replicata	Ccorte	a	b*best	c	Erro	Eficiência média
<i>prfA</i>	nisina livre - 100 mg/L	2115	22	1,03	97655240	0,7	0,002337	0,995
		2223	21	0,96	20101093	0,7	0,001363	
	nisina livre - 1 mg/L	2532	24	1,11	1,23E+08	0,7	0,001454	1,01
		2632	24	0,91	3,05E+10	0,9	0,001277	
	lipossoma branco	3121	25	0,99	5,3E+09	0,8	0,005129	0,985
		3344	23	0,98	4,81E+08	0,8	0,002966	
nisina nanoencapsulada 100 mg/L	4125	24	1,01	1,31E+09	0,8	0,003065	1,01	
	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>sigB</i>	nisina livre - 100 mg/L	2223	21	1,04	13178465	0,7	0,001707	1,04
		-	-	-	-	-	-	-
	nisina livre - 1 mg/L	2521	24	0,98	1,81E+09	0,8	0,002595	0,98
		-	-	-	-	-	-	-
<i>ctsR</i>	nisina livre - 100 mg/L	2132	24	0,89	2,25E+09	0,8	0,001707	0,89
		-	-	-	-	-	-	
	nisina livre - 1 mg/L	2631	22	1,01	2,75E+08	0,8	0,003068	1,01
		2524	25	1,01	2,39E+09	0,8	0,000919	
	lipossoma branco	3133	24	1,02	1,15E+08	0,7	0,006841	0,995
		3125	25	0,97	4,02E+09	0,8	0,006317	
nisina nanoencapsulada 100 mg/L	4211	23	1	8,25E+08	0,8	0,005005	0,985	
	4233	22	0,97	7,58E+09	0,9	0,006268		
		-	-	-	-	-	-	-
<i>virR</i>	nisina livre - 100 mg/L	2131	25	1,03	3988062	0,6	0,041878	1,03
		-	-	-	-	-	-	
	nisina livre - 1 mg/L	2511	28	1,03	8,33E+09	0,8	0,009266	1,03
		-	-	-	-	-	-	
	lipossoma branco	3311	26	0,97	7,53E+10	0,9	0,005551	1
		3335	22	1,03	16027716	0,7	0,001555	
nisina nanoencapsulada 100 mg/L	4245	28	1	5,26E+11	0,9	0,003106	1	
	-	-	-	-	-	-		
		-	-	-	-	-	-	-
<i>lexA</i>	nisina livre - 100 mg/L	2134	23	0,99	4817230	0,6	0,003439	0,99
		-	-	-	-	-	-	
	nisina livre - 1 mg/L	2622	25	0,98	2,15E+08	0,7	0,001962	0,98
		-	-	-	-	-	-	
	lipossoma branco	3221	25	0,91	1,9E+09	0,8	0,002739	0,91
		-	-	-	-	-	-	
nisina nanoencapsulada 100 mg/L	-	-	-	-	-	-	-	
	-	-	-	-	-	-	-	
<i>dnaA</i>	nisina livre - 100 mg/L	-	-	-	-	-	-	-
		-	-	-	-	-	-	-
	nisina livre - 1 mg/L	2532	24	1,03	7,32E+08	0,8	0,004684	1
		2533	26	0,97	1,93E+13	1,1	0,006514	
	lipossoma branco	3231	23	1,01	6,08E+09	0,9	0,008215	1
		3213	21	0,99	78197718	0,8	0,004316	
nisina nanoencapsulada 100 mg/L	4113	25	1,03	1,8E+09	0,8	0,005756	1,03	
	-	-	-	-	-	-		

								Eficiência
Amostras	replicata	Ccorte	a	b*best	c	Erro	média	
<i>kat</i>	nisina livre - 100 mg/L	2121	21	0,99	24650033	0,7	0,004245	0,99
		2125	24	0,99	2,01E+09	0,8	0,001297	
	nisina livre - 1 mg/L	2422	21	1,01	1,1E+08	0,8	0,00108	1,01
		-	-	-	-	-	-	
	lipossoma branco	-	-	-	-	-	-	-
nisina nanoencapsulada 100 mg/L	-	-	-	-	-	-	-	
	-	-	-	-	-	-	-	
1433	nisina livre - 100 mg/L	2321	22	0,96	59285605	0,7	0,001564	0,96
		2315	23	0,96	4,82E+08	0,8	0,001758	
	nisina livre - 1 mg/L	2511	24	1,01	4,18E+08	0,7	0,001425	0,99
		2613	21	0,97	1,48E+08	0,8	0,000349	
	lipossoma branco	3211	23	1,01	1,76E+09	0,8	0,003491	1,01
3311		24	1,01	4,88E+09	0,8	0,002495		
nisina nanoencapsulada 100 mg/L	4321	27	0,98	2,78E+10	0,8	0,004459	1,005	
	4225	29	1,03	1,12E+11	0,8	0,003682		
<i>rpoD</i>	nisina livre - 100 mg/L	2111	22	1	7,6E+08	0,8	0,003363	1
		-	-	-	-	-	-	
	nisina livre - 1 mg/L	2431	24	1,01	1,65E+08	0,7	0,000675	1,005
		2635	23	1	1,03E+09	0,8	0,001516	
	lipossoma branco	3113	24	1	1,1E+08	0,7	0,003398	1,005
3244		21	1,01	14136009	0,7	0,0021		
nisina nanoencapsulada 100 mg/L	4311	28	1	1,86E+09	0,7	0,002304	1	
	-	-	-	-	-	-		
<i>rpsL</i>	nisina livre - 100 mg/L	2225	26	0,96	4,84E+09	0,8	0,001171	0,96
		-	-	-	-	-	-	
	nisina livre - 1 mg/L	2512	23	1	1,78E+08	0,7	0,002817	1
		-	-	-	-	-	-	
	lipossoma branco	3131	25	0,99	2,56E+08	0,7	0,005713	0,99
-		-	-	-	-	-		
nisina nanoencapsulada 100 mg/L	4221	26	0,95	1,33E+10	0,8	0,005451	0,995	
	4115	23	1,04	1,12E+09	0,8	0,005586		
<i>infA</i>	nisina livre - 100 mg/L	2312	22	0,96	60673141	0,7	0,002523	0,96
		-	-	-	-	-	-	
	nisina livre - 1 mg/L	2531	26	1	5,61E+08	0,7	0,001383	0,99
		2624	25	0,98	2,15E+08	0,7	0,001535	
	lipossoma branco	3241	25	0,97	5,96E+09	0,8	0,002604	0,97
-		-	-	-	-	-		
nisina nanoencapsulada 100 mg/L	4221	27	1	1,05E+09	0,7	0,003225	1	
	4241	27	1	1,85E+10	0,8	0,002313		

Tabela A-9.1 – Eficiências de amplificação. Fonte: O autor

Apêndice X – Fatores amostrais e fatores de normalização

Amostra	<i>prfA</i>	<i>sigB</i>	<i>ctsR</i>	<i>lexA</i>	<i>dnaA</i>	<i>virR</i>	<i>kat</i>	<i>1433</i>	<i>rpoD</i>	<i>rpsL</i>	<i>infA</i>	<i>rpoD+rpsL</i>
21X1	0,001129	0,001911	0,001846	0,000506	0,000717	0,000263	0,002845	0,003003	0,001576	0,003532	0,002056	0,002394
22X1	0,000670	0,007085	0,009400	-	0,002492	-	0,001482	0,001941	0,000968	0,001338	0,003350	0,001155
23X1	0,001545	0,004356	0,006864	0,000830	0,002939	0,000262	0,003885	0,003324	0,002000	0,004140	0,002891	0,002920
21X5	0,000410	0,000567	0,000912	0,000183	0,000302	0,000041	0,000653	0,000726	0,000406	0,000810	0,000316	0,000582
21X2	0,000256	0,000488	0,000419	0,000088	-	0,000030	0,000540	0,000550	0,000403	0,000583	-	0,000492
22X2	0,000394	0,002899	0,003550	-	0,001385	0,000070	0,000963	0,000960	0,000741	0,000916	0,001535	0,000836
23X2	0,001090	0,004256	0,005968	0,000418	0,001870	0,000135	0,002101	0,002032	0,001275	0,002622	0,002367	0,001855
22X5	0,000185	0,000334	0,000503	0,000064	0,000205	0,000050	0,000383	0,000409	0,000266	0,000461	0,000216	0,000355
21X3	0,001222	0,003055	0,003627	0,000503	0,001351	0,000120	0,002513	0,002072	0,001293	0,002717	0,002661	0,001902
22X3	0,002743	0,005715	0,005352	0,001155	0,001596	0,000316	0,004314	0,004508	0,002597	0,004499	0,004845	0,003469
23X3	0,000455	0,008548	0,010113	0,000647	0,003828	-	0,000975	0,001183	0,000805	0,001465	0,004769	0,001102
23X5	0,001463	0,004633	-	0,000496	0,002641	0,000145	0,001498	0,002044	0,000976	0,002556	0,001909	0,001603
21X4	0,001610	0,002168	0,003896	0,000529	0,001376	0,000176	0,001870	0,002462	0,001435	0,003689	0,001753	0,002335
22X4	0,005637	0,005163	0,008960	0,001828	0,002441	0,000809	0,008025	0,010954	0,005120	0,012147	0,010840	0,008003
23X4	0,000846	-	0,005395	0,000429	0,002723	0,000090	0,001372	0,001577	0,000900	0,002289	0,002652	0,001457
24X1	0,000527	0,000582	0,000353	0,000234	0,000267	0,000063	0,001531	0,001131	0,000588	0,001205	0,000405	0,000854
25X1	0,000121	-	0,000387	0,000063	0,000093	0,000025	0,000418	0,000358	0,000186	0,000371	0,000250	0,000267
26X1	0,001156	0,001572	0,001993	0,000599	0,000701	0,000162	0,002366	0,002849	0,001345	0,002195	0,001362	0,001744
24X5	0,000093	-	0,000111	0,000057	0,000062	0,000015	0,000209	0,000264	0,000111	0,000241	0,000078	0,000166
24X2	0,004471	0,005115	-	0,002084	0,002494	0,000437	0,007443	0,012699	0,005409	0,009993	0,004755	0,007461
25X2	0,000298	0,000509	0,000466	0,000139	0,000208	0,000050	0,000736	0,000804	0,000431	0,000768	0,000622	0,000584
26X2	0,000344	0,000543	0,000735	0,000193	0,000172	0,000087	0,000964	0,001118	0,000472	0,000994	0,000752	0,000695
25X5	0,010369	0,013317	0,016088	0,005184	0,004954	0,001578	0,018933	0,018004	0,010221	0,048142	0,016925	0,022510
24X3	0,000308	0,000420	0,000382	0,000146	0,000197	0,000060	0,000688	0,000781	0,000307	0,000775	0,000349	0,000495
25X3	0,000085	-	0,000172	0,000030	0,000080	0,000032	0,000274	0,000267	0,000165	0,000248	0,000256	0,000205
26X3	0,004750	0,003673	0,003635	0,002088	0,001970	0,000709	0,007876	0,008741	0,003752	0,010157	0,004277	0,006264
26X5	0,001669	0,001520	0,001185	0,001164	0,000866	0,000222	0,002795	0,003519	0,001500	0,003459	0,000838	0,002311
24X4	0,000127	-	0,000178	0,000060	0,000097	0,000017	0,000337	0,000265	-	0,000309	0,000140	0,000264
25X4	0,000134	0,000234	0,000300	0,000053	0,000155	0,000019	0,000532	0,000411	0,000289	0,000568	0,000334	0,000411
26X4	0,000391	0,000636	0,000854	0,000146	0,000274	0,000072	0,001005	0,000959	0,000513	0,000925	0,000820	0,000699
31X1	0,000451	-	0,000226	0,000093	0,000402	0,000184	0,000071	0,000385	0,000205	0,000425	0,000236	0,000296
32X1	0,001337	-	0,000778	0,000203	0,000840	-	0,000116	0,001121	0,000506	0,001221	0,000475	0,000788
33X1	0,000299	-	0,000313	0,000064	0,000232	0,000152	0,000033	0,000397	0,000206	0,000359	0,000129	0,000273
31X3	0,002205	-	0,000850	0,000358	0,001418	0,000570	0,000197	0,001930	0,000785	0,002003	0,000873	0,001257
32X3	0,008518	-	0,004402	0,001465	0,005636	0,001961	0,000938	0,007151	0,003853	0,007843	0,003650	0,005513
33X3	0,000666	-	0,000495	0,000108	0,000487	0,000171	0,000074	0,000527	0,000357	0,000575	0,000216	0,000455
31X4	0,000324	-	0,000368	0,000051	0,000241	0,000149	0,000087	0,000255	0,000172	0,000300	0,000141	0,000228
32X4	0,010889	-	0,005668	0,002261	0,006379	0,002706	0,001212	0,011588	0,007106	0,011392	0,005681	0,009022
33X4	0,003766	-	0,002323	0,000635	0,002152	0,001092	0,000305	0,003002	0,001399	0,002749	0,000988	0,001967
31X5	0,000506	-	0,000340	0,000079	0,000338	0,000166	0,000072	0,000487	0,000274	0,000469	0,000191	0,000359
32X5	0,005452	-	0,002293	0,000973	0,003098	0,001265	0,000526	0,004347	0,002418	0,003984	0,001969	0,003112
33X5	0,009494	-	0,004123	0,001937	0,004806	0,002170	0,000757	0,011129	0,005978	0,009935	0,003023	0,007728
41X1	0,000447	-	0,001199	0,000092	0,000661	0,000160	0,000048	0,000524	0,000233	0,000527	0,000188	0,000351
42X1	0,000209	-	0,001234	0,000033	0,000474	0,000081	0,000019	0,000171	0,000100	0,000194	0,000122	0,000140
43X1	0,000145	-	0,000785	0,000024	0,000267	0,000104	0,000013	0,000127	0,000063	0,000146	0,000054	0,000097
41X3	0,000031	-	0,001094	0,000006	0,000298	0,000023	0,000003	0,000020	0,000007	0,000015	0,000057	0,000011
42X3	0,000063	-	0,001938	0,000014	0,000541	0,000053	0,000008	0,000054	0,000023	0,000036	0,000150	0,000029
43X3	0,000032	-	-	0,000009	-	0,000039	0,000003	0,000025	0,000005	0,000007	0,000087	0,000006
41X4	0,000235	-	0,011445	0,000181	0,004844	0,000583	0,000107	0,000220	0,000105	0,000125	0,001322	0,000115
42X4	0,000027	-	0,001097	0,000004	0,000503	0,000030	0,000001	0,000012	0,000005	0,000012	0,000014	0,000008
43X4	0,000010	-	0,000357	0,000001	0,000104	0,000009	0,000000	0,000005	0,000001	0,000006	0,000002	0,000002
41X5	0,000573	-	0,000735	0,000151	0,000780	0,000298	0,000093	0,000891	0,000381	0,001060	0,000308	0,000637
42X5	0,000035	-	0,000081	0,000007	0,000067	0,000020	-	0,000026	0,000014	0,000043	0,000015	0,000025
43X5	0,000006	-	0,000003	0,000001	0,000005	-	0,000000	0,000004	0,000001	0,000005	0,000001	0,000002

Tabela A-10.1 – Fatores amostrais e fatores de normalização. Fonte: O autor

Apêndice XI – Fatores amostrais normalizados

Amostra	<i>prfA</i>	<i>sigB</i>	<i>ctsR</i>	<i>lexA</i>	<i>dnaA</i>	<i>virR</i>	<i>kat</i>	<i>1433</i>	<i>rpoD</i>	<i>rpsL</i>	<i>infA</i>
21X1	0,47	0,80	0,77	0,21	0,30	0,11	1,19	1,25	0,66	1,48	0,86
22X1	0,58	6,14	8,14	-	2,16	-	1,28	1,68	0,84	1,16	2,90
23X1	0,53	1,49	2,35	0,28	1,01	0,09	1,33	1,14	0,68	1,42	0,99
21X2	0,52	0,99	0,85	0,18	-	0,06	1,10	1,12	0,82	1,19	-
22X2	0,47	3,47	4,25	-	1,66	0,08	1,15	1,15	0,89	1,10	1,84
23X2	0,59	2,29	3,22	0,23	1,01	0,07	1,13	1,10	0,69	1,41	1,28
21X3	0,64	1,61	1,91	0,26	0,71	0,06	1,32	1,09	0,68	1,43	1,40
22X3	0,79	1,65	1,54	0,33	0,46	0,09	1,24	1,30	0,75	1,30	1,40
23X3	0,41	7,76	9,18	0,59	3,47	-	0,88	1,07	0,73	1,33	4,33
21X4	0,69	0,93	1,67	0,23	0,59	0,08	0,80	1,05	0,61	1,58	0,75
22X4	0,70	0,65	1,12	0,23	0,30	0,10	1,00	1,37	0,64	1,52	1,35
23X4	0,58	-	3,70	0,29	1,87	0,06	0,94	1,08	0,62	1,57	1,82
21X5	0,71	0,98	1,57	0,32	0,52	0,07	1,12	1,25	0,70	1,39	0,54
22X5	0,52	0,94	1,42	0,18	0,58	0,14	1,08	1,15	0,75	1,30	0,61
23X5	0,91	2,89	-	0,31	1,65	0,09	0,93	1,28	0,61	1,59	1,19
24X1	0,62	0,68	0,41	0,27	0,31	0,07	1,79	1,32	0,69	1,41	0,47
25X1	0,45	-	1,45	0,24	0,35	0,09	1,57	1,34	0,70	1,39	0,94
26X1	0,66	0,90	1,14	0,34	0,40	0,09	1,36	1,63	0,77	1,26	0,78
24X2	0,60	0,69	-	0,28	0,33	0,06	1,00	1,70	0,73	1,34	0,64
25X2	0,51	0,87	0,80	0,24	0,36	0,09	1,26	1,38	0,74	1,32	1,07
26X2	0,49	0,78	1,06	0,28	0,25	0,12	1,39	1,61	0,68	1,43	1,08
24X3	0,62	0,85	0,77	0,29	0,40	0,12	1,39	1,58	0,62	1,56	0,71
25X3	0,41	-	0,84	0,14	0,39	0,16	1,33	1,30	0,80	1,21	1,25
26X3	0,76	0,59	0,58	0,33	0,31	0,11	1,26	1,40	0,60	1,62	0,68
24X4	0,48	-	0,67	0,23	0,37	0,06	1,27	1,00	-	1,17	0,53
25X4	0,33	0,57	0,73	0,13	0,38	0,05	1,29	1,00	0,70	1,38	0,81
26X4	0,56	0,91	1,22	0,21	0,39	0,10	1,44	1,37	0,73	1,32	1,17
24X5	0,56	-	0,67	0,34	0,37	0,09	1,26	1,60	0,67	1,45	0,47
25X5	0,46	0,59	0,71	0,23	0,22	0,07	0,84	0,80	0,45	2,14	0,75
26X5	0,72	0,66	0,51	0,50	0,37	0,10	1,21	1,52	0,65	1,50	0,36
31X1	1,52	-	0,76	0,31	1,36	0,62	0,24	1,30	0,69	1,44	0,80
32X1	1,70	-	0,99	0,26	1,07	-	0,15	1,42	0,64	1,55	0,60
33X1	1,10	-	1,15	0,23	0,85	0,56	0,12	1,45	0,75	1,32	0,47
31X3	1,75	-	0,68	0,29	1,13	0,45	0,16	1,53	0,62	1,59	0,69
32X3	1,55	-	0,80	0,27	1,02	0,36	0,17	1,30	0,70	1,42	0,66
33X3	1,47	-	1,09	0,24	1,07	0,38	0,16	1,16	0,79	1,27	0,48
31X4	1,42	-	1,61	0,23	1,05	0,65	0,38	1,12	0,76	1,32	0,62
32X4	1,21	-	0,63	0,25	0,71	0,30	0,13	1,28	0,79	1,26	0,63
33X4	1,91	-	1,18	0,32	1,09	0,56	0,15	1,53	0,71	1,40	0,50
31X5	1,41	-	0,95	0,22	0,94	0,46	0,20	1,35	0,76	1,30	0,53
32X5	1,75	-	0,74	0,31	1,00	0,41	0,17	1,40	0,78	1,28	0,63
33X5	1,23	-	0,53	0,25	0,62	0,28	0,10	1,44	0,77	1,29	0,39
41X1	1,27	-	3,41	0,26	1,88	0,46	0,14	1,49	0,66	1,50	0,53
42X1	1,50	-	8,83	0,24	3,39	0,58	0,13	1,23	0,72	1,39	0,87
43X1	1,50	-	8,14	0,25	2,77	1,07	0,14	1,32	0,66	1,52	0,56
41X3	2,92	-	101,79	0,55	27,77	2,11	0,28	1,85	0,69	1,44	5,27
42X3	2,16	-	66,91	0,49	18,67	1,83	0,26	1,85	0,81	1,23	5,16
43X3	5,68	-	-	1,67	-	7,07	0,56	4,40	0,84	1,19	15,67
41X4	2,04	-	99,45	1,57	42,10	5,06	0,93	1,91	0,91	1,09	11,48
42X4	3,31	-	133,68	0,53	61,31	3,60	0,15	1,51	0,66	1,51	1,73
43X4	4,11	-	147,57	0,38	42,88	3,59	0,14	2,24	0,41	2,43	0,68
41X5	0,90	-	1,15	0,24	1,22	0,47	0,15	1,40	0,60	1,66	0,48
42X5	1,42	-	3,27	0,27	2,69	0,79	-	1,05	0,57	1,73	0,60
43X5	3,03	-	1,84	0,76	2,54	-	0,16	2,25	0,37	2,66	0,50

Tabela A-11.1 – Fatores amostrais normalizados. Fonte: O autor

Apêndice XII – Níveis de expressão gênica – estudo temporal da resposta

Amostra	<i>prfA</i>	<i>sigB</i>	<i>ctsR</i>	<i>lexA</i>	<i>dnaA</i>	<i>virR</i>	<i>kat</i>	1433	<i>rpoD</i>	<i>rpsL</i>	<i>infA</i>
21X2	1,10	1,24	1,10	0,84	-	0,56	0,92	0,89	1,24	0,80	-
22X2	0,81	0,57	0,52	-	0,77	-	0,90	0,68	1,06	0,95	0,63
23X2	1,11	1,54	1,37	0,79	1,00	0,81	0,85	0,96	1,00	1,00	1,29
21X3	1,36	2,01	2,47	1,25	2,37	0,57	1,11	0,87	1,03	0,97	1,63
22X3	1,36	0,27	0,19	-	0,21	-	0,97	0,77	0,89	1,12	0,48
23X3	0,78	5,20	3,90	2,07	3,45	-	0,67	0,94	1,07	0,94	4,37
21X4	1,46	1,16	2,16	1,07	1,97	0,69	0,67	0,84	0,93	1,07	0,87
22X4	1,21	0,11	0,14	-	0,14	-	0,78	0,81	0,76	1,31	0,47
23X4	1,10	-	1,58	1,04	1,86	0,69	0,71	0,95	0,90	1,11	1,84
21X5	1,50	1,22	2,03	1,49	1,73	0,64	0,94	0,99	1,06	0,94	0,63
22X5	0,90	0,15	0,17	-	0,27	-	0,84	0,68	0,89	1,12	0,21
23X5	1,73	1,94	-	1,09	1,64	1,01	0,70	1,12	0,89	1,12	1,20

Tabela A-12.1 – Níveis de expressão gênica – estudo temporal da resposta. Fonte: O autor

Apêndice XIII – Médias e erros populacionais – estudo temporal da resposta

Amostra	<i>prfA</i>	<i>sigB</i>	<i>ctsR</i>	<i>lexA</i>	<i>dnaA</i>	<i>virR</i>	<i>kat</i>	1433	<i>rpoD</i>	<i>rpsL</i>	<i>infA</i>
2XX1	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
2XX2	1,107	1,391	1,237	0,818	1,001	0,684	0,888	0,927	1,124	0,900	1,289
2XX3	1,071	3,606	3,189	1,657	2,911	0,572	0,888	0,906	1,050	0,953	3,000
2XX4	1,280	1,164	1,870	1,054	1,912	0,687	0,691	0,896	0,918	1,090	1,357
2XX5	1,611	1,580	2,034	1,290	1,685	0,826	0,823	1,058	0,974	1,034	0,918

Tabela A-13.1 – Médias populacionais – estudo temporal da resposta. Fonte: O autor

Amostra	<i>prfA</i>	<i>sigB</i>	<i>ctsR</i>	<i>lexA</i>	<i>dnaA</i>	<i>virR</i>	<i>kat</i>	1433	<i>rpoD</i>	<i>rpsL</i>	<i>infA</i>
2XX1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
2XX2	0,00	0,09	0,08	0,02	-	0,13	0,03	0,02	0,09	0,07	-
2XX3	0,18	1,01	0,51	0,29	0,44	-	0,14	0,02	0,01	0,01	0,87
2XX4	0,13	-	0,21	0,01	0,04	0,00	0,01	0,03	0,01	0,01	0,34
2XX5	0,07	0,23	-	0,14	0,04	0,18	0,08	0,04	0,06	0,06	0,20

Tabela A-13.2 – Erros populacionais – estudo temporal da resposta. Fonte: O autor

Apêndice XIV – Médias dos fatores amostrais normalizados

Amostra	<i>prfA</i>	<i>sigB</i>	<i>ctsR</i>	<i>lexA</i>	<i>dnaA</i>	<i>virR</i>	<i>kat</i>	1433	<i>rpoD</i>	<i>rpsL</i>	<i>infA</i>
2XX1/100	0,53	2,81	3,75	0,25	1,15	0,10	1,27	1,36	0,73	1,35	1,58
2XX2/100	0,53	2,25	2,77	0,20	1,33	0,07	1,13	1,12	0,80	1,23	1,56
2XX3/100	0,62	3,67	4,21	0,39	1,55	0,08	1,15	1,15	0,72	1,35	2,37
2XX4/100	0,66	0,79	2,16	0,25	0,92	0,08	0,92	1,17	0,62	1,56	1,31
2XX5/100	0,71	1,60	1,49	0,27	0,91	0,10	1,05	1,22	0,68	1,43	0,78
2XX1/1	0,58	0,79	1,00	0,29	0,35	0,09	1,57	1,43	0,72	1,35	0,73
2XX2/1	0,53	0,78	0,93	0,27	0,31	0,09	1,22	1,56	0,71	1,36	0,93
2XX3/1	0,60	0,72	0,73	0,26	0,37	0,13	1,33	1,42	0,67	1,47	0,88
2XX4/1	0,46	0,74	0,87	0,19	0,38	0,07	1,33	1,12	0,72	1,29	0,84
2XX5/1	0,58	0,62	0,63	0,36	0,32	0,09	1,10	1,31	0,59	1,70	0,53
3XX1	1,44	-	0,97	0,27	1,09	0,59	0,17	1,39	0,70	1,43	0,62
3XX3	1,59	-	0,85	0,26	1,07	0,39	0,16	1,33	0,70	1,43	0,61
3XX4	1,51	-	1,14	0,27	0,95	0,50	0,22	1,31	0,75	1,33	0,58
3XX5	1,46	-	0,74	0,26	0,85	0,38	0,16	1,40	0,77	1,29	0,52
4XX1	1,43	-	6,79	0,25	2,68	0,70	0,14	1,35	0,68	1,47	0,66
4XX3	3,59	-	84,35	0,90	23,22	3,67	0,37	2,70	0,78	1,28	8,70
4XX4	3,15	-	126,90	0,83	48,76	4,08	0,41	1,88	0,66	1,67	4,63
4XX5	1,78	-	2,09	0,42	2,15	0,63	0,15	1,56	0,52	2,02	0,53

Tabela A-14.1 – Médias dos fatores amostrais normalizados. Fonte: O autor

Apêndice XV – Médias e erros populacionais – estudo dose dependente

Amostra	<i>prfA</i>	<i>sigB</i>	<i>ctsR</i>	<i>lexA</i>	<i>dnaA</i>	<i>virR</i>	<i>kat</i>	1433	<i>rpoD</i>	<i>rpsL</i>	<i>infA</i>
2XX1/100	0,912	3,548	3,742	0,869	3,255	1,154	0,806	0,947	1,011	0,998	2,166
2XX2/100	0,984	2,888	2,986	0,761	4,258	0,809	0,928	0,717	1,117	0,904	1,676
2XX3/100	1,029	5,117	5,762	1,533	4,221	0,592	0,867	0,810	1,068	0,922	2,702
2XX4/100	1,444	1,064	2,474	1,328	2,438	1,116	0,686	1,040	0,869	1,205	1,561
2XX5/100	1,228	2,565	2,356	0,746	2,834	1,184	0,946	0,938	1,160	0,842	1,480

Tabela A-15.1 – Médias populacionais – estudo dose dependente. Fonte: O autor

Amostra	<i>prfA</i>	<i>sigB</i>	<i>ctsR</i>	<i>lexA</i>	<i>dnaA</i>	<i>virR</i>	<i>kat</i>	1433	<i>rpoD</i>	<i>rpsL</i>	<i>infA</i>
2XX1/100	0,08	1,33	1,62	0,11	1,19	0,13	0,04	0,08	0,06	0,05	0,61
2XX2/100	0,06	0,61	0,70	0,07	0,80	0,13	0,05	0,03	0,06	0,05	0,23
2XX3/100	0,16	2,09	2,11	0,31	1,87	0,08	0,06	0,04	0,07	0,05	0,73
2XX4/100	0,18	0,22	0,73	0,17	0,99	0,23	0,03	0,09	0,01	0,04	0,33
2XX5/100	0,16	0,74	0,16	0,13	0,86	0,19	0,07	0,11	0,10	0,07	0,36

Tabela A-15.2 – Erros populacionais – estudo dose dependente. Fonte: O autor

Apêndice XVI – Médias e erros populacionais – expressão gênica diferencial

Amostra	<i>prfA</i>	<i>sigB</i>	<i>ctsR</i>	<i>lexA</i>	<i>dnaA</i>	<i>virR</i>	<i>kat</i>	1433	<i>rpoD</i>	<i>rpsL</i>	<i>infA</i>
3XX1	2,73	-	0,26	1,08	0,95	5,90	0,13	1,03	0,96	1,06	0,39
3XX3	2,58	-	0,20	0,67	0,69	5,13	0,14	1,15	0,98	1,06	0,26
3XX4	2,30	-	0,53	1,07	1,03	6,32	0,24	1,12	1,20	0,85	0,45
3XX5	2,05	-	0,49	0,97	0,93	3,80	0,15	1,14	1,13	0,90	0,66

Tabela A-16.1 – Médias populacionais – expressão gênica diferencial – condição experimental lipossomo branco, como situação questionada e nisina livre na concentração de 100 mg/L, como situação calibradora. Fonte: O autor

Amostra	<i>prfA</i>	<i>sigB</i>	<i>ctsR</i>	<i>lexA</i>	<i>dnaA</i>	<i>virR</i>	<i>kat</i>	1433	<i>rpoD</i>	<i>rpsL</i>	<i>infA</i>
3XX1	0,20	-	0,10	0,13	0,35	0,63	0,02	0,08	0,06	0,05	0,11
3XX3	0,29	-	0,08	0,10	0,31	0,63	0,01	0,07	0,04	0,05	0,06
3XX4	0,19	-	0,14	0,08	0,42	1,10	0,07	0,08	0,02	0,02	0,08
3XX5	0,23	-	0,05	0,12	0,27	0,62	0,02	0,02	0,04	0,03	0,12

Tabela A-16.2 – Erros populacionais – expressão gênica diferencial – condição experimental lipossomo branco, como situação questionada e nisina livre na concentração de 100 mg/L, como situação calibradora. Fonte: O autor

Amostra	<i>prfA</i>	<i>sigB</i>	<i>ctsR</i>	<i>lexA</i>	<i>dnaA</i>	<i>virR</i>	<i>kat</i>	1433	<i>rpoD</i>	<i>rpsL</i>	<i>infA</i>
4XX1	2,71	-	1,81	1,00	2,32	7,06	0,11	0,99	0,93	1,09	0,41
4XX3	5,83	-	20,04	2,28	15,00	47,64	0,32	2,34	1,08	0,95	3,66
4XX4	4,79	-	58,64	3,31	52,93	51,43	0,44	1,61	1,06	1,08	3,54
4XX5	2,50	-	1,40	1,57	2,35	6,23	0,15	1,28	0,75	1,41	0,68

Tabela A-16.3 – Médias populacionais – expressão gênica diferencial – condição experimental nisina nanoencapsulada, como situação questionada e nisina livre na concentração de 100 mg/L, como situação calibradora. Fonte: O autor

Amostra	<i>prfA</i>	<i>sigB</i>	<i>ctsR</i>	<i>lexA</i>	<i>dnaA</i>	<i>virR</i>	<i>kat</i>	1433	<i>rpoD</i>	<i>rpsL</i>	<i>infA</i>
4XX1	0,12	-	0,75	0,11	0,86	1,26	0,00	0,08	0,05	0,05	0,11
4XX3	1,19	-	7,58	0,69	6,80	13,31	0,05	0,40	0,04	0,04	1,16
4XX4	0,57	-	14,37	0,99	21,71	7,51	0,18	0,13	0,13	0,15	1,56
4XX5	0,55	-	0,30	0,45	0,72	1,22	0,01	0,15	0,06	0,13	0,12

Tabela A-16.4 – Erros populacionais – expressão gênica diferencial – condição experimental nisina nanoencapsulada, como situação questionada e nisina livre na concentração de 100 mg/L, como situação calibradora. Fonte: O autor

Apêndice XVII – Médias e erros populacionais – análise complementar

Amostra	<i>prfA</i>	<i>sigB</i>	<i>ctsR</i>	<i>lexA</i>	<i>dnaA</i>	<i>virR</i>	<i>kat</i>	1433	<i>rpoD</i>	<i>rpsL</i>	<i>infA</i>
3XX1	2,49	-	0,96	0,94	3,08	6,81	0,11	0,97	0,97	1,06	0,85
3XX3	2,66	-	1,17	1,02	2,93	3,03	0,12	0,93	1,04	0,97	0,69
3XX4	3,32	-	1,30	1,42	2,52	7,06	0,17	1,16	1,05	1,03	0,70
3XX5	2,52	-	1,17	0,73	2,64	4,50	0,14	1,07	1,31	0,76	0,98

Tabela A-17.1 – Médias populacionais – análise complementar – condição experimental lipossomo branco, como situação questionada e nisina livre na concentração 1 mg/L, como situação calibradora. Fonte: O autor

Amostra	<i>prfA</i>	<i>sigB</i>	<i>ctsR</i>	<i>lexA</i>	<i>dnaA</i>	<i>virR</i>	<i>kat</i>	1433	<i>rpoD</i>	<i>rpsL</i>	<i>infA</i>
3XX1	0,25	-	0,19	0,08	0,27	0,42	0,02	0,05	0,03	0,04	0,13
3XX3	0,30	-	0,12	0,14	0,14	0,25	0,00	0,05	0,07	0,06	0,10
3XX4	0,45	-	0,28	0,18	0,18	1,44	0,05	0,10	0,02	0,04	0,09
3XX5	0,25	-	0,13	0,11	0,35	0,41	0,02	0,13	0,10	0,06	0,18

Tabela A-17.2 – Erros populacionais – análise complementar – condição experimental lipossomo branco, como situação questionada e nisina livre na concentração 1 mg/L, como situação calibradora. Fonte: O autor