

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

Análise proteômica comparativa de *Listeria monocytogenes* exposta a concentrações subletais de nisina

Dissertação de Mestrado

Kendi Nishino Miyamoto

Porto Alegre, Junho de 2013

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

Análise proteômica comparativa de *Listeria monocytogenes* exposta a concentrações subletais de nisina

Dissertação submetida ao Programa de Pós Graduação em Biologia Celular e Molecular da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Biologia Celular e Molecular

Kendi Nishino Miyamoto

Orientador: Dr. Adriano Brandelli

Co-orientador: Dr. Henrique Bunselmeyer Ferreira

Porto Alegre, Junho de 2013

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Microbiologia e Bioquímica Aplicada, do Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos da UFRGS, no Laboratório de Genômica Estrutural e Funcional do Centro de Biotecnologia da UFRGS e no Laboratório Nacional de Biociências do Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais; sendo financiada pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)

“Live a good life. If there are gods and they are just, then they will not care how devout you have been, but will welcome you based on the virtues you have lived by. If there are gods, but unjust, then you should not want to worship them. If there are no gods, then you will be gone, but will have lived a noble life that will live on in the memories of your loved ones.”

Marcus Aurelius

Agradecimentos

Aos meus familiares, sem os quais jamais teria sequer entrado em uma faculdade e ter despertado meu interesse pelo conhecimento e de todas suas benéficas. Muito obrigado pelo suporte emocional e financeiro desde os tempos do ensino médio e da faculdade.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul, por ser uma instituição comprometida com a formação do aluno, fornecendo-lhe condições ideais para o desenvolvimento de suas potencialidades profissionais.

Aos meus orientadores: Dr. Adriano Brandelli e Dr. Henrique Bunselmeyer Ferreira, com os quais tive o orgulho e o privilégio de trabalhar. Muito obrigado por compartilharem parte das suas vastas experiências de vida, conhecimento e conselhos com os quais levarei e lembrarei durante toda minha jornada profissional. Agradeço imensamente pela amizade, confiança depositada em meu trabalho, por serem minhas referências de profissionais comprometidos com o desenvolvimento do conhecimento e por sempre fazerem sugestões e críticas em momentos cruciais durante a confecção deste trabalho.

Aos membros da minha comissão de acompanhamento (Dr. Diego Bonatto e Dra. Patrícia Valente) pelas inúmeras contribuições que me foram dadas durante a execução deste trabalho. Em especial, agradeço ao Dr. Diego Bonatto pelos inúmeros conselhos e sugestões que ajudaram a moldar não somente este trabalho, mas também parte da minha atual visão como um aprendiz de pesquisador.

Às minhas “madrinhas” da proteômica, a Dra. Karin Caumo e Dra. Karina Monteiro, que com muita paciência (tanto para aguentar meus intermináveis questionamentos como suportar minhas crises existenciais até mesmo fora do RS) ensinaram-me sobre o fascinante mundo da proteômica. Muito obrigado por dividirem parte dos seus conhecimentos e experiências, além das inúmeras dicas e sugestões ao longo destes anos.

Ao laboratório de espectrometria de massas do Laboratório Nacional de Biociências, de Campinas – SP, especialmente às Dras. Adriana Franco Paes Leme e Bianca Alves Pauletti pelo suporte técnico-científico enquanto estive realizando as análises.

À Msc. Karina Lorenzatto pela paciência em me ajudar nos ensaios da catalase e pelas nossas inúmeras conversas e conselhos durante o tempo que estive no laboratório. Também meu muito obrigado aos meus colegas do Laboratório 210, atuais e antigos, (Veridiana, Daiani, Cristine, Jéssica, Gabriela, Taylor, Rafaela, Fernanda) com os quais tornavam meus dias de trabalho muito mais agradáveis. Sem vocês, fazer 2DE poderia ser muito pior ainda. Por falar nisso, agradeço ao pessoal do *Mycoplasma* (Veridiana, Taylor, Jéssica e Rafaela) por terem passado frio e quase surdos com a centrífuga por minha culpa! Obrigado pela companhia e pela amizade de todos vocês!

Aos “vizinhos” de laboratório do 206 e 204 (Martín, Caroline, Guilherme, João, Tatiana, Edileuza, Matheus, Sergio, Aline e Bruna), meu obrigado pela companhia no RU, conversas, sugestões e pela amizade.

Aos meus colegas do laboratório 218 - ICTA (Jamile, Stela, Karla, Ana, Voltaire, Indjara, Carlos, Roberta, Taís e Fernanda Lopes) pela amizade, conversas, junções, e pelas ideias e sugestões dadas.

Aos meus amigos-quase-irmãos do laboratório 219 (Raquel Calloni, Fernanda, Raquel Ayres, Bruno, Joice, Itamar, Maurício, Gabrihel, Renata, Larissa, Louise, Patrick e Pedro), meu obrigado por serem muito mais do que companhias durante a hora do almoço, mas por serem amigos, com os quais partilhei boa parte das minhas alegrias e frustrações durante o mestrado. Muito obrigado por existirem!

À Silvinha e ao Luciano, por serem exemplos de funcionários, sempre atendendo com um eficiência excepcional, além de serem prestativos e atenciosos. Muito obrigado por me ajudarem a resolver as burocracias do PPG e das bolsas!

À CAPES e o CNPq pelo suporte financeiro fundamentais para a execução deste trabalho.

Aos Drs. Roberto Christ Vianna Santos e Rodrigo de Almeida Vaucher, por serem meus exemplos de profissionais durante a faculdade e por terem me estimulado a buscar a pós-graduação fora da cidade. Muito obrigado pelos seus inúmeros ensinamentos e pela amizade.

À Alice Joeci Greff, que com muito carinho e atenção me acolheu em sua casa durante estes anos. Muito obrigado pelas nossas conversas e por ter se preocupado comigo frequentemente durante minhas crises durante o mestrado.

Ao casal de amigos Alcício e Maria Cristina Stabel, amigos santa-marienses radicados na capital, com os quais partilhei muitas boas conversas e debates acalorados, que me ajudaram a esquecer um pouco da saudade que tive de Santa Maria durante os primeiros meses que estive em Porto Alegre. Muito obrigado!

Ao meu grande amigo Matheus Oliveira, que foi sempre um grande irmão e sempre me ajudou a tomar decisões importantes, além de ser uma grande companhia para discutir temas diversos, desde filosofia até futebol. Muito obrigado pelas nossas inúmeras conversas via Facebook! Também agradeço aos amigos William Molinos e Guilherme Dias, amigos historiadores, que sempre pude contar quando as coisas na capital não estavam muito boas. Aos demais amigos dos Tenebrosos, por serem sempre fiéis amigos e companheiros para uma boa conversa, risadas e um futebol no domingo. Obrigado imensamente a todos vocês!

À família Brum, os quais considero como minha segunda família, não só pela amizade construída durante esses anos todos, mas por também serem um exemplo de família na qual todos deveriam se espelhar. Agradeço imensamente por cada minuto que convivi ao lado de vocês!

Aos meus ex-colegas de colégio, Leonardo Miotti, Felipe Peroni, Anderson Brum, Lucas Gai, Bruno Lauda, Felipe Marconato, Felipe Flores, Cláudia Flores, Marília Ravanello, Thaís Foletto, Anelise Krug, amigos os quais não importa a distância, sempre estaremos juntos (pelo menos em pensamento). Muito obrigado por fazerem parte da minha vida!

Por fim, caso tenha esquecido de alguém, além de pedir desculpas, agradeço por ter contribuído de alguma forma!

Muito obrigado a todos!

"Nurture your mind with great thoughts; to believe in heroic makes heroes"

Benjamin Disraeli

Lista de abreviaturas, símbolos e unidades:

AIDS – *Acquired Immunodeficiency syndrome*

ATCC – *American Type Culture Collection*

ATP – *Adenosin triphosphate*

BALs – Bactérias produtoras de ácido láctico

BHI – *Brain heart infusion*

BLAST – *Basic Local Alignment Search Tool*

BSHs – *Bile salt hydrolases*

CoA – Coenzima A

CDC - *Center for diseases and infection control*

CDC – Citolisina dependente de colesterol

CNPEM – Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais

DDA – *Data dependent acquisition*

DTT - Ditionitrito

ECDC – *European Center for Diseases Prevention and Control*

EFSA – *European Food Safety Agency*

EROs – Espécies reativas do oxigênio

ESI – Electrospray ionization

FAO – *Food and Agriculture Organization*

FDA - *Food and drug agency*

GlcNAc – N-Acetilglicosamina (NAG)

GO – *Gene ontology*

GRAS – *Generally recognized as safe*

HIV – *Human immunodeficiency virus*

HSP – *Heat shock proteins*

KEGG - *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*

LC-MS/MS – Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas em tandem

LLO – Listeriolisina O

LNBio - Laboratório Nacional de Biociências

MurNAc – Ácido N-acetilmurâmico (NAM)

NCBI – *National Center for Biotechnology Information*

OD – *Optical Density*

pH – Potencial hidrogeniônico

PI3K – Fosfatidilinositol-3-quinase

Q-ToF – *Quadrupole + Time of flight*

PBPs – *Penicillin binding protein*

PCA – Proteína carreadora de radical acila

rpm – rotações por minuto

RTE – *Ready to eat*

SCX – *Strong cationic exchange column*

TFA – *Trifluoroacetic acid*

Tris – Tris (hidroximetil) aminometano

UPLC – *Ultra Performance Liquid Chromatography*

WHO – *World Health Organization*

Sumário

Resumo.....	10
Abstract	11
1. Introdução	12
1.1 <i>Listeria monocytogenes</i>	12
1.1.1 Infecções por <i>Listeria monocytogenes</i> em seres humanos e animais.....	12
1.1.2 Epidemiologia	13
1.1.3 Fatores de virulência	15
1.2 Bacteriocinas	17
1.2.1 Definição de bacteriocinas	17
1.2.2 Histórico das bacteriocinas.....	17
1.2.3 Diversidade de bacteriocinas.....	18
1.2.4 Classificação.....	19
1.3 Nisina	23
1.3.1 Aplicações	23
1.3.2 Operon da nisina e biossíntese	24
1.3.3 Mecanismo de ação da nisina.....	28
1.3.4 Resistência à nisina	29
2. Justificativa e objetivos gerais:	30
2.1 Objetivos específicos.....	31
3. Materiais e métodos	32
3.1 Cultivo e determinação da curva de crescimento em <i>Listeria monocytogenes</i>	32
3.2 Determinação da atividade de nisina.....	32
3.3 Extração de proteínas	32
3.4 Espectrometria de massas.....	33
3.4.1 Preparação das amostras.....	33
3.4.2 Análise das amostras por LC-MS/MS.....	34
3.4.3 Análise de dados de LC-MS/MS.....	35
3.4.4 Classificação funcional das proteínas identificadas	36
3.4.5 Determinação da atividade da catalase por decaimento do peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂).....	36
4. Resultados	38
4.1 Determinação da curva de crescimento padrão de <i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 7644.	38
4.2 Determinação da atividade de nisina.....	39

4.3 Extração de proteínas	40
4.4 Espectrometria de massas.....	42
4.4.1 Análise dos dados de LC-MS/MS	42
4.4.2 Classificação funcional das proteínas identificadas	45
4.5 Ensaio da atividade da catalase por decaimento do peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂)	51
5. Discussão.....	53
6. Conclusões e perspectivas	58
7. Referências Bibliográficas:	60
Curriculum Vitae.....	70

Resumo

Infecções por *Listeria monocytogenes* têm sido frequentemente relatadas em vários casos de surtos de infecção alimentar pelo mundo. Logo, a preocupação em tornar produtos alimentares de larga escala livres destes patógenos tem aumentado ao longo dos anos. Uma das estratégias mais eficazes são a utilização de bacteriocinas como agentes conservantes, prevenindo a multiplicação bacteriana durante os processos de fabricação, estocagem e distribuição dos produtos. A nisina é uma das bacteriocinas mais conhecidas, sendo empregada na indústria alimentícia por muitos anos. Seu mecanismo de atividade antimicrobiana principal é através da formação de um complexo, juntamente com um precursor de parede celular (lipídio II), que formam poros na membrana celular, causando o extravasamento de conteúdos celulares vitais e a perda de estabilidade eletrolítica, levando à morte celular. Entretanto, algumas evidências apontam para mecanismos alternativos, mas ainda desconhecidos, de morte celular. Uma das abordagens interessantes é por meio da análise dos processos celulares (comparado a uma condição não tratada com nisina) através de metodologias proteômicas. Os cultivos bacterianos foram tratados com concentrações subletais de nisina e os extratos proteicos foram processados em espectrometria de massas em tandem acoplado a um sistema de cromatografia líquida (LC-MS/MS). Os resultados mostraram expressão diferencial de algumas proteínas que atuam contra o estresse oxidativo, como a catalase e proteínas de armazenamento de íons ferrosos. Também verificou-se a superexpressão de uma HSP, a qual pode alterar o dobramento correto de algumas proteínas como a de divisão celular FtsZ. Por fim, a subexpressão de uma chaperona responsável pelo correto dobramento das *penicillin binding proteins* (PBPs) e a superexpressão de enzimas responsáveis pela síntese de lipídios precursores da membrana celular podem apontar para um sistema de divisão celular alternativo, agindo provavelmente como uma resposta à presença de membranas cobertas por complexos nisina e lipídio II

Abstract

Listeria monocytogenes infections have been frequently reported in many food poisoning outbreaks around the world. Therefore, the concern about protecting largely-scale food products from these pathogens has been rising over the years. One of the most efficient strategies is using bacteriocins as a conserving agent, preventing the growth of pathogenic bacteria during the production, storage and distribution of the product. Nisin is a well-known bacteriocin, which has been applied in the food industry for many years. Its main antimicrobial mechanism is based in forming a cell membrane pore creator complex, which coupled with a cell wall precursor (lipid II), leads to the leakage of essential cell life compounds and the loss of electrolytic stability, causing the cell death. However, recent evidences lead to an alternative, but still unknown, cell death mechanism. One interesting approach is analyzing the cell processes (compared to a non-nisin treated condition) by a proteomic approach. The *L. monocytogenes* cells were treated with a sublethal concentration of nisin and the protein extracts were ran through a tandem mass spectrometry attached to a liquid chromatography system (LC-MS/MS). The results showed differential expression of some agents against oxidative stress such as catalase and ferrous ions storage proteins. Furthermore, it had also presented upregulation of a HSP which can alter the correct folding of other proteins, such as the FtsZ cell division protein. Finally, the downregulation of a chaperone that is responsible of the correct folding of penicillin binding proteins (PBPs) and the superexpression of some enzymes related to the production of cell membrane lipids could point out to a different bacterial cell division system, acting probably as a response to the nisin-lipid II complexes covered cell membranes.

1. Introdução

1.1 *Listeria monocytogenes*

Listeria monocytogenes é uma bactéria gram positiva, responsável por surtos de infecções (listeriose) principalmente no trato gastrointestinal de seres humanos. Uma de suas características marcantes é a capacidade de sobreviver e multiplicar-se bem mesmo sob situações adversas, como em baixas temperaturas, em baixo pH e em altas concentrações de sais (KRAMARENKO *et al.*, 2013). Essa maleabilidade nas condições de crescimento favorece a contaminação em alimentos mesmo após um longo período de refrigeração, o que auxilia na multiplicação bacteriana no trato gastrointestinal humano (MARTINS & LEAL GERMANO, 2011). Logo, alimentos são a maior fonte de infecção por *L. monocytogenes* em humanos, sendo os produtos lácteos (queijo, leite, iogurte, nata azeda, etc.) e derivados de carne os mais afetados, não excluindo também a contaminação ocasional em vegetais e frutas (KRAMARENKO *et al.*, 2013)

1.1.1 Infecções por *Listeria monocytogenes* em seres humanos e animais

As infecções por *L. monocytogenes* são classificadas essencialmente pela forma invasiva ou não invasiva da bactéria. A forma não invasiva é responsável pelos sintomas clássicos que atingem o trato gastrointestinal, levando a sintomas como febre e diarreia, podendo evoluir para uma gastroenterite (SWAMINATHAN & GERNER-SMIDT, 2007). Infecções na pele são também comuns nessa forma, especialmente em profissionais que atuam na pecuária e lidam com animais contaminados (peões, veterinários, zootecnistas, etc.) (BARANCELLI *et al.*, 2011).

A forma invasiva possui como característica a invasão do microrganismo para a corrente sanguínea, podendo, atravessar as barreiras hemato-encefálica, intestinal e placentária, provocando meningites, encefalites, infecções no globo ocular, peritonites, endocardites e até mesmo abortos em gestantes (SWAMINATHAN & GERNER-SMIDT, 2007). É importante ressaltar que casos como estes são bastante incomuns em indivíduos saudáveis. Logo, grande parte dos pacientes com casos de listeriose invasiva

possuem algum fator de risco, sendo mais comuns em pacientes com a idade avançada, em gestação, com algum tipo de imunodeficiência, em tratamento de imunossupressão, em transplantados, com insuficiência renal ou hepática, dentre outros. (SWAMINATHAN & GERNER-SMIDT, 2007; MUÑOZ *et al.*, 2012; CDC, 2013).

Em animais, casos de listeriose têm sido comumente relatados na comunidade científica nos últimos anos. Grande parte das fontes de contaminação têm sido oriundas da silagem mal produzida ou estocada. Isso favorece a proliferação do microrganismo, afetando diversos animais como aves, bovinos, caprinos, ovinos e suínos (RISSI *et al.*, 2006; BARANCELLI *et al.*, 2011; BARBUDDHE *et al.*, 2012; SCOTT, 2013). A listeriose em animais possui sintomas bastante similares à de seres humanos, ao provocar diarreia, encefalite, mastite, e, em casos mais extremos, causar sepses, aborto e encefalites, podendo levar o animal ao óbito (ORNDORFF *et al.*, 2006; RAMASWAMY *et al.*, 2007).

1.1.2 Epidemiologia

Os casos de infecções por *L. monocytogenes* são bastante heterogêneos, variando de acordo com o hábito alimentar da população local. Recentemente, alimentos como salsichas, peixes defumados, queijos, dentre outros, produzidos para consumo direto (alimentos prontos para consumo, *Ready to eat* - RTE), têm causado preocupação em alguns países devido ao surgimento de surtos de listeriose (SWAMINATHAN & GERNER-SMIDT, 2007; SANT'ANA *et al.*, 2012). Por se tratarem de produtos comercializados em diversos locais, podem causar surtos até mesmo em países distantes do seu local de produção. Em dezembro de 2012, nos Estados Unidos, 20 pessoas (de 14 diferentes estados) foram hospitalizadas (das quais 4 foram à óbito) por ingerirem um queijo tipo ricota importado da Itália, contaminado por *L. monocytogenes* (CDC, 2012a).

Os casos de listeriose, nos últimos anos, embora não demonstrem crescimento, ainda apresentam valores elevados. Dados recentes da União Europeia mostram que, durante o ano de 2010, foram confirmados 1601 casos de listeriose, 47 a menos em relação ao ano anterior (ECDC, 2012). Deste total, 19% e 23%, respectivamente, são provenientes da França e da Alemanha (ECDC, 2012; EFSA, 2012). Nos Estados

Unidos, em 2011, 621 casos de listeriose foram reportados (53 a menos em comparação com o ano de 2010), por 47 dos 50 Estados, dos quais cerca de 95% (590 casos) eram da forma invasiva, levando à óbito 105 dos 486 pacientes hospitalizados (CDC, 2012b, 2013). Esse alto número pode ser explicado em razão do aumento no número de pacientes de risco (idosos, portadores do vírus HIV, pacientes em quimioterapia e/ou radioterapia, transplantados, dentre outros) que, por apresentarem um sistema imunológico deficiente, adquiriam a infecção bacteriana com maior facilidade (GOULET *et al.*, 2008).

Muitos dos países que relatam uma baixa incidência de casos de listeriose podem não representar necessariamente o panorama epidemiológico esperado. Um dos países que merece atenção nesse contexto é a Índia. Por questões culturais e religiosas, o país possui um alto consumo e produção de leite e derivados, sendo considerado o maior produtor do mundo (FAO, 2001). Com o consumo em grande escala destes alimentos, também é natural a existência de casos de laticínios contaminados por *L. monocytogenes*. Pesquisas apontam que 8,1% do total de leite produzido e não pasteurizado na Índia são contaminados por *L. monocytogenes* (BARBUDDHE *et al.*, 2012). Apesar de existirem dados sobre a prevalência deste microrganismo em diversos alimentos no país, dados de casos de listeriose são pouco relatados na literatura. Isso se deve à falta de equipes de vigilância epidemiológica no país e de métodos mais precisos de identificação, tornando os dados disponíveis escassos, imprecisos e subestimados.

No Brasil, as informações de surtos de listeriose também são muito escassas. A exemplo da Índia, o Brasil também não possui um sistema de vigilância epidemiológica para casos de listeriose. Um dos reflexos disto é a grande quantidade de casos não identificados em surtos de infecções alimentares. Em 2011, em 289 (81%) dos 356 casos reportados não foram detectados seus agentes etiológicos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011), o que explica a baixa incidência nos relatos de listeriose das equipes de saúde pública. Embora haja pesquisas envolvendo o estudo de alimentos contaminados por *L. monocytogenes* (NES *et al.*, 2010; BARANCELLI *et al.*, 2011; SANT'ANA *et al.*, 2012), além do perfil de susceptibilidade antimicrobiana de alguns isolados clínicos (LEMES-MARQUES; CRUZ & DESTRO, 2007; REIS *et al.*, 2011), ainda é preciso um maior controle dos casos em escala estadual e nacional. Isso permitirá controlar o alastramento das possíveis fontes de contaminação, bem como aprimorar as políticas sanitárias vigentes para auxiliar na eficaz eliminação do patógeno (CRUZ; MARTINEZ & DESTRO, 2008).

1.1.3 Fatores de virulência

Com o intuito de compreender o processo de infecção de *L. monocytogenes*, têm se estudado mecanismos de virulência essenciais para a adesão e invasão da célula bacteriana nos diversos tecidos humanos e animais. Por se tratar de um microrganismo cuja fonte inicial de infecção é o trato gastrointestinal, *L. monocytogenes* possui sistemas para proteção contra os sais biliares, por meio de enzimas que catalisam a hidrólise da bile (BSHs), impedindo sua ação como detergente sobre a célula bacteriana (BEGLEY *et al.*, 2005).

Para a adesão e invasão da célula hospedeira são utilizadas proteínas de reconhecimento, as internalinas (DUSSURGET; PIZARRO-CERDA & COSSART, 2004). A internalina A possui um receptor para E-caderina, tipicamente uma glicoproteína transmembrana de adesão célula-célula, facilitando a junção entre microrganismo e célula hospedeira. A internalina B, por sua vez, é responsável pela invasão celular, através do reconhecimento de sequências Leu-Arg-Arg (LRR) por meio do receptor Met, da família das tirosino-quinases. Esse reconhecimento provoca uma fosforilação transitória de proteínas do hospedeiro (Cbl, Gab1, e Shc), levando à ativação da PI3K, que pode atuar na reorganização do citoesqueleto, afetando a polimerização dos filamentos de actina, provocando assim, a internalização da bactéria na célula eucariótica (IRETON *et al.*, 1996).

Já no interior do citoplasma hospedeiro, a célula bacteriana dispõe de um operon denominado de ilha de patogenicidade da *Listeria* 1 (LIP-1). As proteínas codificadas por este operon são responsáveis pela proteção contra enzimas do vacúolo digestivo e seu rompimento, além de auxiliar no movimento, multiplicação dos microrganismos e invasão das células vizinhas (DUSSURGET; PIZARRO-CERDA & COSSART, 2004). O gene *prfA*, presente neste operon, produz uma proteína homônima responsável pela regulação dos genes *actA*, *hly*, *plcA*, *plcB* e *mpl* do mesmo operon LIP-1, além de outros fatores de virulência como os genes das internalinas A e B (*inlA* e *inlB*) (VÁZQUEZ-BOLAND *et al.*, 2001).

Para a ruptura do vacúolo digestivo, o gene *hly* produz uma proteína denominada listeriolisina O (LLO), uma citolisina dependente de colesterol (CDC), que ao se oligomerizar, forma poros na membrana do fagossomo (SCHNUPF & PORTNOY, 2007). Concomitantemente com a ação da LLO, são produzidas fosfolipases do tipo C (PLCs), produtos dos genes *plcA* e *plcB*, que originam dois tipos, respectivamente, de

PLCs: uma fosfatidilinositol e glicosil-fosfatidilinositol específica (PI-PLCs) e outra de fosfatidilcolina (PC-PLC) mais abrangente, podendo hidrolisar uma série de fosfolípídios como a esfingomiéline (DUSSURGET; PIZARRO-CERDA & COSSART, 2004). Essas PLCs podem ser fundamentais na dissolução da membrana, juntamente com a atividade da LLO, auxiliando a ruptura da membrana do vacúolo e promovendo a fuga da bactéria para o citoplasma (HAMON *et al.*, 2012).

Uma vez no citoplasma da célula hospedeira, inicia-se o processo de multiplicação bacteriana. Pouco se sabe sobre seus requerimentos nutricionais para a replicação. Um dos açúcares disponíveis no citoplasma, a glicose-1-fosfato, através da expressão (dependente de *prfA*) do gene *hpt*, um transportador de hexose-fosfato e estrutural e funcionalmente similar ao transportador da glicose-6-fosfato eucariótica (DUSSURGET; PIZARRO-CERDA & COSSART, 2004; LUNGU; RICKE & JOHNSON, 2009). Após a replicação, as bactérias conseguem se locomover pelo citoplasma através da proteína codificada pelo gene *actA*, que se liga nas proteínas Arp2/3, formando complexos que induzem a polimerização dos filamentos de actina (TRAVIER *et al.*, 2013). Dessa forma, a bactéria é capaz de alcançar a célula hospedeira adjacente e, com o auxílio da LLO e das PLCs (PI-PLC e PC-PLC), formar um novo fagossomo (fagossomo secundário), desta vez formado por duas membranas (uma de cada célula), lisar as membranas do fagossomo, replicar-se e invadir a célula seguinte (ORNDORFF *et al.*, 2006).

1.2 Bacteriocinas

1.2.1 Definição de bacteriocinas

Bacteriocinas são, por definição clássica, peptídeos produzidos por bactérias (em sua maioria Gram positivas produtoras de ácido láctico - BALs) com restrito espectro de atividade antimicrobiana (geralmente com microrganismos relacionados com o ambiente em que a espécie produtora se encontra) (JACK; TAGG & RAY, 1995). Entretanto, estudos mais recentes mostram a necessidade de reavaliar a sua definição, uma vez que a atividade desses peptídeos oscilam bastante de acordo com diversos fatores ambientais (pH, temperatura, concentração de sais, etc.) (ROJO-BEZARES *et al.*, 2007; SANT'ANNA *et al.*, 2011). Alguns compostos estudados, cujas características se assemelham às bacteriocinas (espectro de atividade restrito, baixa massa molecular, etc), mas que ainda não estão bem caracterizados, são chamados de substâncias semelhantes à bacteriocinas (*bacteriocin-like substances*, BLS) (MOTTA; LORENZINI & BRANDELLI, 2007).

1.2.2 Histórico das bacteriocinas

O termo “bacteriocina” foi utilizado pela primeira vez para descrever um composto peptídico com atividade antimicrobiana isolado de cepas de *Escherichia coli*, denominadas “colicinas” (JACOB *et al.*, 1953 apud COTTER; HILL; ROSS, 2005). Entretanto, estudos anteriores feitos por Louis Pasteur e Jules François Joubert, em 1877, mostraram compostos que apresentavam ação antimicrobiana contra *Bacillus anthracis* em bactérias isoladas de amostras de urina (REA *et al.*, 2011). Acredita-se, também, que a humanidade tem se aproveitado – mesmo que de forma indireta - das qualidades das bacteriocinas há mais de 8000 anos, ao produzir inúmeros alimentos fermentados que possuíam bactérias produtoras de bacteriocinas (COTTER; HILL & ROSS, 2005).

Em 1928, cientistas descobriram, na Inglaterra, um composto peptídico produzido por cepas de *Lactococcus lactis*, a partir da observação do processo de fabricação de queijos (ROGERS & WHITTIER, 1928). Logo, percebeu-se que esse composto era responsável por proteger o alimento de agentes decompositores e de

outras BALs. Na Nova Zelândia, foi descoberto um composto com as mesmas propriedades (WHITEHEAD, 1933) e, em 1947, essa substância foi nomeada como nisina (*group N staphylococci Inhibitory Substance*) (MATTICK & HIRSCH, 1947). A descoberta da nisina é considerada um dos marcos mais importantes da pesquisa envolvendo bacteriocinas, haja vista que ela é comercializada desde 1953 até os dias atuais, sendo empregada na produção de diferentes alimentos em escala industrial (COTTER; HILL & ROSS, 2005). Desde então, têm se buscado outros compostos com capacidade similar ou superior à nisina, tendo em vista seu valor econômico na indústria alimentícia, além da emergência de possíveis microrganismos resistentes ao peptídeo (MAISNIER-PATIN & RICHARD, 1996; RILEY & WERTZ, 2002b; YEAMAN & YOUNT, 2003).

1.2.3 Diversidade de bacteriocinas

Segundo algumas estimativas, acredita-se que 99% de todas as bactérias, além dos organismos do domínio *Archaea*, produzem pelo menos um tipo de bacteriocina (KLAENHAMMER, 1993; RILEY & WERTZ, 2002b). Entretanto, muitos compostos ainda não foram descobertos em virtude do desconhecimento das condições ideais de produção pela bactéria, que pode, por exemplo, depender de um estímulo via *quorum sensing* (MALDONADO-BARRAGÁN; RUIZ-BARBA & JIMÉNEZ-DÍAZ, 2009) ou até mesmo ser disparada pelo sistema SOS de reparo ao dano celular (RILEY & WERTZ, 2002b). Logo, é relevante verificar as características ambientais da bactéria produtora em seu estado inicial com o intuito de mimetizar essas condições em cultivo laboratorial, uma vez que mudanças de temperatura, pH e disponibilidade de nutrientes podem inclusive acarretar na não produção ou até mesmo na perda de atividade antimicrobiana das bacteriocinas estudadas (HENG *et al.*, 2007; SANT'ANNA *et al.*, 2011).

Das bacteriocinas já descritas, grande parte são oriundas de bactérias Gram positivas (ZACHAROF & LOVITT, 2012), destacando-se os gêneros *Bacillus*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus* e *Streptococcus*. Segundo o banco de dados BACTIBASE, há disponíveis e descritas 177 bacteriocinas, das quais 156 (88%) são de bactérias Gram positivas e somente 18 (10%) de bactérias Gram negativas.

A grande predominância de bactérias Gram positivas descritas se dá pela abundante presença desses microrganismos em alguns alimentos, atuando como agentes modificadores das propriedades organolépticas dos produtos e, concomitantemente, como agentes de proteção contra microrganismos patogênicos (SETTANNI & CORSETTI, 2008), especialmente em alimentos vegetais fermentados como o chucrute, pickles norte-americano, o *kimchi* (repolho chinês fermentado em uma pasta apimentada, típica da culinária sul-coreana) e em produtos lácteos como o queijo, iogurte e a nata azeda (*sour cream*) (MCKAY & BALDWIN, 1990).

Em bactérias Gram-negativas, grande parte das bacteriocinas descritas são produzidas por cepas de *Escherichia coli* (RILEY & WERTZ, 2002b). Por serem uma das primeiras bacteriocinas descritas na literatura científica, além da sua grande diversidade, as colicinas são, inclusive, utilizadas para estudos evolutivos (RILEY, 1998; RILEY & WERTZ, 2002a). Entretanto, já existem bacteriocinas bem descritas produzidas por outras espécies, como *Klebsiella pneumoniae* (JAMES, 1988), *Pseudomonas aeruginosa* (MICHEL-BRIAND & BAYSSE, 2002) e *Serratia marcescens* (GUASCH *et al.*, 1995).

Já no domínio *Archaea*, há poucos representantes de microrganismos produtores de bacteriocinas. Estudos mostram um grupo de peptídeos antimicrobianos denominados archaeocinas, cuja única família descrita é a das halocinas (RILEY & WERTZ, 2002b). Elas são produzidas por espécies da ordem das halobactérias e possuem atividades contra diferentes tipos de microrganismos extremófilos, mas somente quando presentes em altas concentrações de sais (SHAND, 2006).

1.2.4 Classificação

Com o avanço na descoberta de novas bacteriocinas, surgiu a necessidade de categorizar todo o rol de peptídeos descritos pela comunidade científica. A classificação baseada no espectro de atividade antimicrobiana era inviável, pois havia muitos compostos com o mesmo perfil de atividade (REA *et al.*, 2011). Entretanto, as propriedades físico-químicas, bem como seu aparato de produção (genes codificadores de transportadores, de proteínas de imunidade, dentre outros) são significativamente heterogêneas. Fazendo-se valer disso, KLAENHAMMER (1993) propôs uma classificação baseada em algumas propriedades físicas, químicas e biológicas

(sensibilidade ao calor, faixa de pH com maior atividade, massa molecular, dentre outros), comuns de estudos *a priori* (GEIS; SINGH; TEUBER, 1983 e KOZAK; BARDOWSKI; DOBRZAŃSKI, 1978), que lhe permitiram dividir em quatro grandes classes como mostra a Tabela 1:

Classificação	Descrição	Características	Exemplos
Classe I (lantibióticos)	Bacteriocinas modificadas pós traducionalmente	Possuem resíduos de aminoácidos incomuns (como a lantionina e/ou β -metil lantionina).	mersacidina, nisina, subtilina
Classe II	Peptídeos não modificados	Peptídeos ativos na membrana, com baixa massa molecular (<10 kDa) e termoestáveis	pediocinas, leucocinas, enterocinas
Classe III (bacteriolisinas)	Peptídeos não modificados	Peptídeos termolábeis e de alta massa molecular (>30 kDa)	lisostafina, enterolisina A

Tabela 1- Classificação proposta por Klaenhammer (1993), adaptado de Rea *et al.* (2011)

É importante ressaltar que essa classificação foi estabelecida inicialmente com base em dados de bacteriocinas de BALs (COTTER; HILL & ROSS, 2005). Isso se deve à origem das pesquisas serem oriundas de espécies produtoras que possuem alguma relação com alimentos, além do fato de serem mais seguras para a aplicação na indústria alimentícia (como conservantes) e na saúde humana e animal.

Esta classificação, contudo, tem sido alvo de discussões. Alguns autores têm sugerido a reestruturação da ordem vigente, pois ela não contempla grupos de bacteriocinas com características peculiares, tornando a divisão demasiadamente generalista, além de manter grupos com poucos integrantes (HENG & TAGG, 2006). A classe III, por sua vez, passou a ser chamada de Bacteriolisinas, por serem considerados enzimas líticas e não peptídeos líticos, em virtude do seu alto peso molecular (> de 30 kDa) (COTTER; HILL; ROSS, 2005 e HENG *et al.*, 2007).

As bacteriocinas de Classe I compreendem basicamente os lantibióticos, ou seja, peptídeos contendo em sua estrutura resíduos de lantionina e/ou β -metil lantionina, além de obrigatoriamente possuírem atividade antimicrobiana. É importante ressaltar isto,

uma vez que há inúmeros peptídeos com resíduos desses aminoácidos não canônicos, que, no entanto, não possuem atividade antimicrobiana relatada (JACK; TAGG & RAY, 1995; REA *et al.*, 2011). Seu mecanismo principal de atividade é através da interação do peptídeo com o lipídio II da membrana da célula bacteriana, facilitando sua inserção na membrana, formando um complexo que impede a síntese de precursores de peptidoglicano podendo formar poros que facilitam a saída de íons essenciais e de componentes, levando a morte celular (BIERBAUM & SAHL, 2009). Dentre os constituintes deste grupo, destaca-se a nisina, dada sua importância na indústria alimentícia (SOBRINO-LÓPEZ & MARTÍN-BELLOSO, 2008; NISHIE; NAGAO & SONOMOTO, 2012), além de serem alvos de estudos para aplicação potencial na medicina (TONG *et al.*, 2010; FIELD *et al.*, 2012; CAMPION *et al.*, 2013). Outros compostos bastantes conhecidos são a subtilina, mersacidina e a epidermina, (APPLEYARD *et al.*, 2009 e WILLEY; VAN DER DONK, 2007). Quanto à classificação, alguns autores defendem a subdivisão da classe I de acordo com sua estrutura final dos peptídeos (JUNG, 1991), dividindo-os em lineares (tipo A) e em globulares (tipo B). Em contrapartida, outros autores defendem a divisão em três grupos (I,II e III) de acordo com os tipos de enzimas responsáveis pelas modificações pós-traducionais, clivagem da sequência líder e secreção da bacteriocina (PAG & SAHL, 2002; WILLEY & VAN DER DONK, 2007).

As bacteriocinas de classe II compreendem basicamente peptídeos não modificados, de baixo peso molecular (menor que 10 kDa) e termoestáveis (COTTER; HILL & ROSS, 2005). Geralmente produzidas por BALs, esse grupo compreende basicamente três grupos: os compostos similares à pediocina (IIa), as bacteriocinas com dois peptídeos (IIb) e as bacteriocinas cíclicas (IIc) (NES, I. F.; BREDE & DIEP, 2013). Estas bacteriocinas não necessitam de uma maquinaria pós-traducional mais complexa (como os lantibióticos) acarretando na sua facilidade de produção em larga escala, que aliada com a sua boa atividade contra alguns patógenos de importância clínica, são fatores que impulsionam a prospecção de bacteriocinas de classe II para uso farmacológico ou em alimentos (MILLETTE *et al.*, 2008).

O grupo IIa é constituído por peptídeos de 37 a 48 aminoácidos de extensão e possui uma atividade bastante eficiente contra bactérias do gênero *Listeria*, sendo eficiente mesmo em quantidades na concentração de nanomolares. O mecanismo básico desse grupo se baseia na formação de poros através do complexo da manose-fosfotransferase (Man-PTS), na qual a região C-terminal do peptídeo identifica e se liga

irreversivelmente a este complexo (presente nas membranas das células bacterianas sensíveis), causando a abertura de seus poros e acarretando na depleção de ATP e a saída de íons (principalmente K^+) para o meio extracelular, provocando a morte da célula bacteriana (LOHANS & VEDERAS, 2012; NES; BREDE & DIEP, 2013).

A classe IIb compreende bacteriocinas que possuem dois peptídeos codificados por diferentes genes adjacentes entre si que somente possuem atividade antimicrobiana quando atuam juntos e são inibidas por uma mesma proteína de imunidade do produtor. Seu mecanismo de atividade ainda não foi caracterizado, mas acredita-se que seus mecanismos de ação sejam similares aos compostos de classe IIa, ou seja, na formação de poros facilitada por proteínas específicas da membrana bacteriana (NES; BREDE & DIEP, 2013).

Por fim, a classe IIc compreende os peptídeos circulares, formados por 4 a 5 α -hélices com um centro hidrofóbico. Possuem atividade contra algumas bactérias Gram positivas de importância médica e por ser estável e resistente a proteases (NES; BREDE & DIEP, 2013), podem ser bons candidatos a serem utilizados na indústria alimentícia (sendo alguns inclusive já reconhecidos como GRAS) ou até mesmo como potenciais antimicrobianos. Entretanto, para isso é necessário uma pesquisa mais extensa dos seus mecanismos de atividade, fato este que ainda se mostra bastante incipiente (VAN BELKUM; MARTIN-VISSCHER & VEDERAS, 2011).

1.3 Nisina

A nisina é uma bacteriocina de classe I (lantibióticos) oriunda de uma cepa de *Lactococcus lactis*, descoberta inicialmente por ROGERS & WHITTIER (1928). Geralmente produzida na fase *mid-log* de crescimento bacteriano, é bastante eficaz contra bactérias Gram-positivas (como *Bacillus cereus* e *Listeria monocytogenes*) e também quando em combinação com agentes que auxiliam a entrada do peptídeo no espaço transmembrana das bactérias Gram negativas (BRÖTZ & SAHL, 2000; PAG & SAHL, 2002). Possui 34 aminoácidos, com um peso molecular de aproximadamente 3,5 kDa e possui um resíduo de lantionina e β -metil lantionina na sua estrutura. Outros aminoácidos não-canônicos presentes são a dideidroalanina (Dha) e a dideihidrobutirina (Dhb). Quimicamente, sua solubilidade, estabilidade e atividade estão intrinsecamente relacionadas com o seu pH, sendo mais estável em meio ácido (2-5). Além disso, é relativamente termoestável, podendo manter sua conformação em até 115°C, sendo vantajosa na aplicação em alimentos preparados em altas temperaturas (DE VUYST & VANDAMME, 1994; DE ARAUZ *et al.*, 2009).

1.3.1 Aplicações

Desde 1953, a nisina é comercializada na indústria alimentícia como um aditivo, entretanto seu uso mais intensivo se deu pela década de 80, especialmente quando a FDA/EUA, em 1988, conferiu à nisina o certificado de GRAS (*Generally Recognized as Safe* – geralmente reconhecido como seguro), que prevê a livre utilização do produto sem causar nenhum dano a curto e/ou longo prazo à saúde humana (COTTER; HILL & ROSS, 2005). Produtos contendo nisina, como o Nisaplin® (Danisco/DuPont, Copenhagen, Dinamarca), são muito utilizados nos processos de fabricação de alimentos por serem termoestáveis e preservarem a qualidade do alimento durante os processos de logística e estocagem (COTTER; HILL & ROSS, 2005).

Por apresentar uma baixa citotoxicidade, além de ser facilmente degradada por enzimas do sistema digestivo, possíveis aplicações na medicina têm sido estudadas. Dentre elas, uma das mais promissoras é contra o tratamento de bactérias multirresistentes, como as cepas de *Enterococcus sp.* resistentes à vancomicina (VRE) e *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) (PIPER *et al.*, 2009). Embora haja um rápido decréscimo na atividade do peptídeo após subseqüentes exposições em

algumas cepas mais sensíveis, (SEVERINA; SEVERIN & TOMASZ, 1998), a combinação entre nisina e outros compostos como a ramoplanina (ou até mesmo outros lantibióticos) podem atenuar a aquisição de mecanismos de resistência e, concomitantemente, garantir a eficácia do tratamento (BRUMFITT; SALTON & HAMILTON-MILLER, 2002), além de fornecer uma valiosa alternativa para o tratamento dessas cepas multirresistentes, dada sua baixa toxicidade (MONTALBÁN-LÓPEZ *et al.*, 2011).

Ainda nas aplicações na saúde humana, tem sido estudada a utilização da nisina em tratamentos odontológicos para a prevenção da cárie bacteriana (TONG *et al.*, 2010), assim como tratamento da gengivite (MONTALBÁN-LÓPEZ *et al.*, 2011) e infecções no canal radicular (TURNER; LOVE & LYONS, 2004). Outra aplicação interessante é o possível uso (em conjunto com outros lantibióticos ou antimicrobianos clássicos) em infecções gástricas persistentes por *Helicobacter pylori* (KIM *et al.*, 2003) e em uso ginecológico para tratamento de infecções vaginais (GUPTA *et al.*, 2009) e na utilização como contraceptivo (atuando na imobilização do espermatozoide) (ARANHA; GUPTA & REDDY, 2004).

1.3.2 Operon da nisina e biossíntese

O operon da nisina, além de sua sequência codificadora (*nisA*), possui genes que participam dos processos enzimáticos (modificações pós-traducionais e clivagem do peptídeo líder) de maturação do pré-peptídeo (*nisB*, *nisC*, *nisP*), transporte (*nisT*), regulação (*nisR* e *nisK*) e genes de imunidade (*nisI*, *nisF*, *nisE*, *nisG*) (PATTON & VAN DER DONK, 2005), conforme ilustrado na Figura 1:

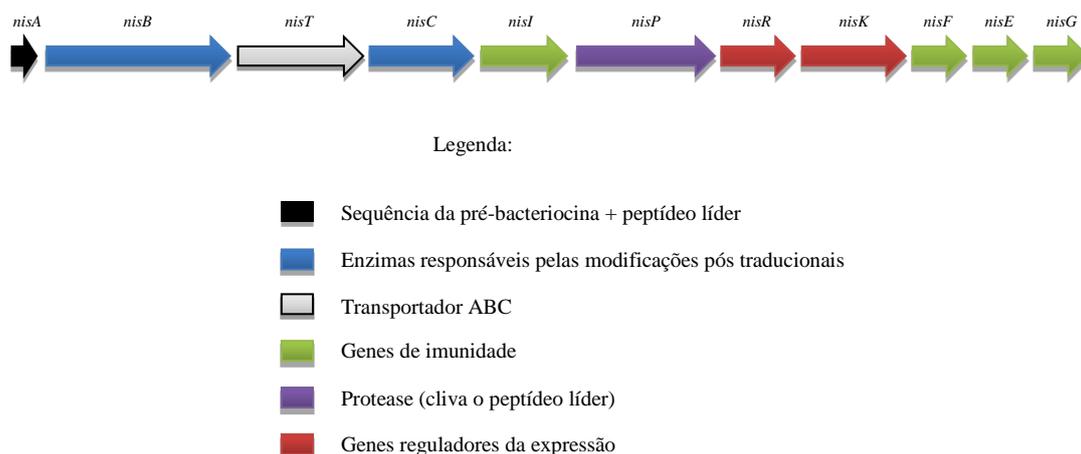


Figura 1 - Operon da nisina de *Lactococcus lactis*. Adaptado de Xie & Van Der Donk (2004)

A biossíntese da nisina envolve quatro processos: desidratação, ciclização, proteólise e transporte/excreção (Figura 2) (PATTON & VAN DER DONK, 2005; BREUKINK & DE KRUIJFF, 2006). Inicialmente, o gene *nisA* codifica o peptídeo precursor, formando um peptídeo com uma sequência líder na região N-terminal (cuja função acredita-se ser essencial para manter o peptídeo inativo até ser exportada da célula bacteriana, além de auxiliar na sinalização do peptídeo para exportação) (BONELLI; WIEDEMANN & SAHL, 2006). Em seguida, sofre um processo de desidratação nos resíduos de serina e treonina na porção C-terminal com o auxílio da enzima produzida pelo gene *nisB* (Figura 2A), formando, respectivamente, a dideidroalanina (Dha) e a didehidrobutirina (Dhb) (WILLEY & VAN DER DONK, 2007). Com a enzima ciclase do gene *nisC*, os aminoácidos desidratados ligam-se com a porção tiol de resíduos de cisteína mais próximo, formando uma ponte tioéter, conforme mostra a Figura 2B. Por fim, um transportador ABC (NisT) faz a bacteriocina ser exportada para o meio extracelular, e após isso, uma serino-protease (NisP) cliva a sequência líder, formando a nisina em seu estado final (Figura 2C/D) (PATTON & VAN DER DONK, 2005). Durante sua produção, os peptídeos produzidos também servirão como mediadores de controle na expressão da mesma e de seus mecanismos de imunidade, por meio das proteínas codificadas pelos genes *nisR* e *nisK* (PATTON; VAN DER DONK, 2005 e XIE; VAN DER DONK, 2004).

A fim de evitar que a própria nisina atue na célula produtora, existem dois mecanismos de imunidade constituintes no *operon* da nisina, formado pelas proteínas codificadas pelos genes *nisI* e os genes do complexo *nisF/E/G*. Estes formam um complexo transportador ABC que é responsável pela condução do peptídeo da membrana para o meio extracelular, mesmo após a formação de poros, sem prejudicar

sua atividade antimicrobiana (ALKHATIB *et al.*, 2012). Já a NisI é uma lipoproteína ancorada na membrana que parece ser essencial para o mecanismo de imunidade, pela comparação de susceptibilidade de *knockouts* de cepas de *Lactococcus lactis* produtoras de nisina, sendo maior para o gene *nisI* em comparação aos genes *nisF/E/G* (SIEGERS & ENTIAN, 1995; DRAPER *et al.*, 2008). Entretanto, seus mecanismos ainda não estão bem claros, embora se acredite que sua região C-terminal seja essencial para a imunidade contra a nisina, atuando possivelmente no reconhecimento do peptídeo, além de sua produção estar possivelmente reguladas de acordo com a produção do composto na célula (TAKALA & SARIS, 2006)

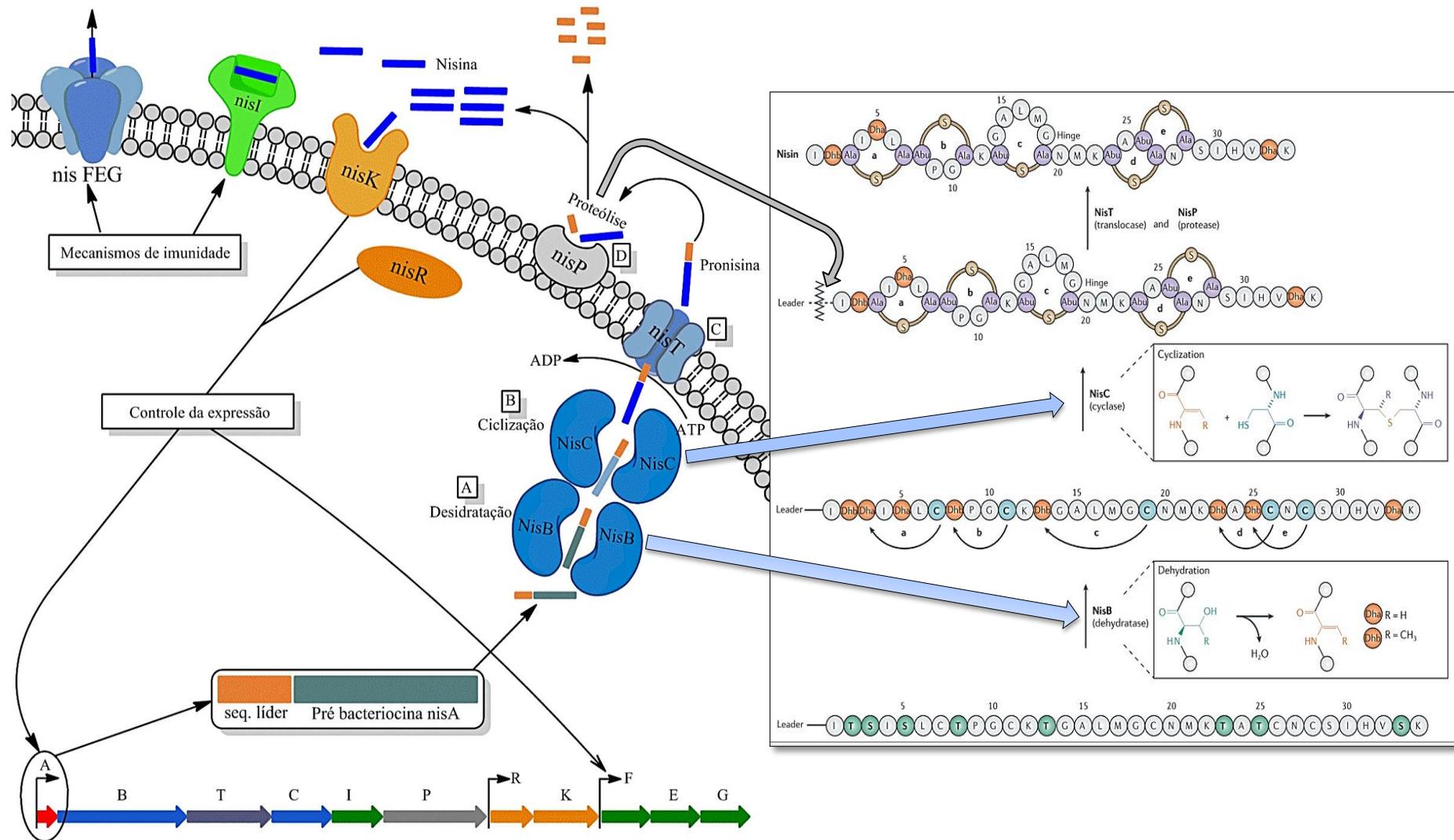


Figura 2 - Representação dos processos de biossíntese, controle e mecanismos de imunidade de nisin em *Lactococcus lactis*. A figura à esquerda representa os processos a nível celular e a figura à direita, o processo de biossíntese a nível molecular. O gene *nisA* codifica a pré bacteriocina mais a sequência líder, passando por processos de desidratação (A) e ciclização (B), sendo transportadas para o meio extracelular (C) com o auxílio de um transportador ABC, sofre clivagem da sequência líder (D), formando a nisin em seu estado final. As proteínas NisK e NisR mostram os mecanismos de controle da expressão de nisin as setas indicam os genes controlados. Já o complexo NisFEG e a proteína NisI auxiliam na proteção da bactéria contra o peptídeo produzido. Editado e adaptado a partir de imagens de BREUKINK & DE KRUIJFF (2006) e PATTON & VAN DER DONK (2005)

1.3.3 Mecanismo de ação da nisina

A atividade antimicrobiana da nisina se dá basicamente pela interação do peptídeo com a membrana celular bacteriana por meio do acúmulo de peptídeos na superfície da membrana, forçando a inserção da nisina no interior da membrana; e por meio de um ancoramento do peptídeo com o lipídio II, componente precursor da parede de peptideoglicano (BREUKINK & DE KRUIJFF, 2006). O primeiro mecanismo foi somente demonstrado através de sistemas de membranas modelo (DRIESSEN *et al.*, 1995), pois a afinidade com a membrana celular é muito baixa, tornando o processo de inserção e formação de poros na membrana muito intermitente. Acredita-se que o processo de inserção na membrana siga o modelo “sanduíche”, na qual os peptídeos se inserem causando uma curvatura da membrana, fazendo que o sítio hidrofílico do peptídeo interaja com a cabeça do fosfolipídio e, paralelamente, o sítio hidrofóbico interaja com a cauda (BROGDEN, 2005), como ilustra a Figura 3:

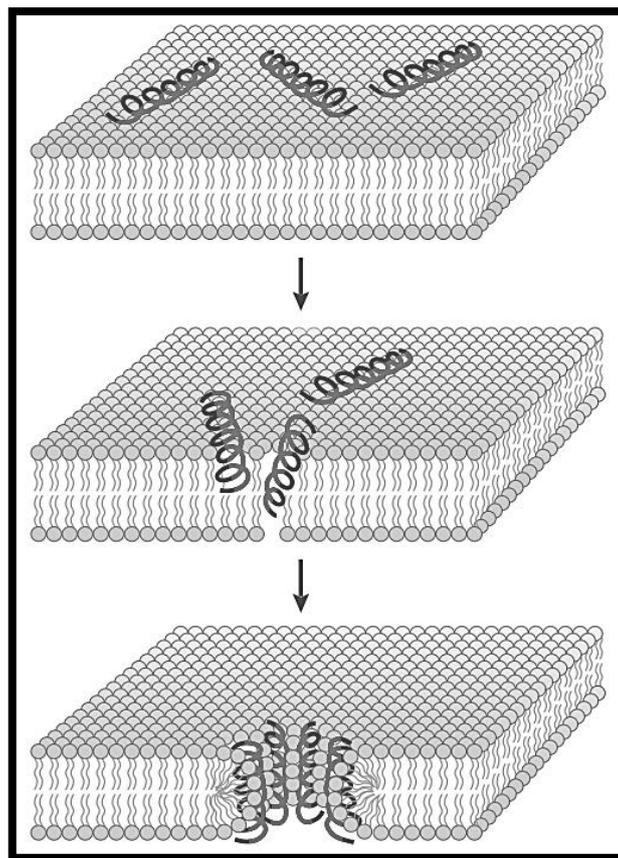


Figura 3 - Modelo "Sanduíche" de inserção do peptídeo na membrana e formação de poros. Em cinza, a porção hidrofílica e, em preto, a porção hidrofóbica do peptídeo. (Adaptado de Brogden (2005))

Já através do mecanismo dependente de lipídio II, a porção N-terminal da nisina forma, junto com este glicopeptídeo, uma ligação estável na região pirofosfato preso ao açúcar MurNAc (ácido N-acetilmurâmico) (BREUKINK & DE KRUIJFF, 2006). A estabilidade é tal que a presença da nisina prejudica o transporte de MurNAc e GlcNAc (N-acetilglucosamina) para a matriz da parede celular (WIEDEMANN *et al.*, 2001). Já ligados, a porção C-terminal da nisina auxilia na formação de um complexo de várias moléculas de nisina e lipídio II, formando um poro que, posteriormente, levará a célula a um desequilíbrio eletrostático e, conseqüentemente, à morte celular (BREUKINK & DE KRUIJFF, 2006). Mesmo sendo essencial para a atividade antimicrobiana, a formação de poros não é o único mecanismo de atividade antimicrobiana dependente de lipídio II. Estudos mostraram uma atividade quantitativamente similar da mutacina 1140, peptídeo que também faz ligação estável com o lipídio II, porém não é capaz de formar poros na membrana (SMITH *et al.*, 2008), mostrando que deve existir outro mecanismo mediado pela ligação entre nisina e lipídio II (BREUKINK & DE KRUIJFF, 2006).

1.3.4 Resistência à nisina

Recentemente, alguns casos de resistência têm surgido em decorrência do seu grande uso em alimentos. Alguns pesquisadores sugerem que o desenvolvimento da resistência pode ocorrer de diversas maneiras. (KAUR; MALIK *et al.*, 2011; KAUR; SINGH *et al.*, 2011). Dentre elas, estão: modificações na composição dos fosfolipídios da membrana bacteriana (MING & DAESCHEL, 1995; VERHEUL *et al.*, 1997), modificações na estrutura da parede celular, na carga final da membrana (evitando assim a atração/adesão do peptídeo) (CRANDALL & MONTVILLE, 1998; PAIVA; BREUKINK & MANTOVANI, 2011) e, por fim, a presença de uma enzima inativadora (nisinase) (DE VUYST & VANDAMME, 1994). Assim, é indispensável conhecer as linhagens que comumente causam contaminação em alimentos, bem como seu perfil de sensibilidade a diferentes bacteriocinas, a fim de evitar seu uso contínuo e o desenvolvimento de cepas resistentes (CRANDALL & MONTVILLE, 1998).

2. Justificativa e objetivos gerais:

Desde sua descoberta e caracterização, têm se buscado compreender os mecanismos de atividade da nisina em microrganismos susceptíveis. Embora já esteja bem elucidado de que a bacteriocina se liga na porção pirofosfato do lipídio II (LEE & KIM, 2011), há evidências de possíveis mecanismos alternativos não relacionados com a formação de poros, por meio da construção de híbridos de mutacina 1140 (SMITH *et al.*, 2008) mostrando que mesmo sem a formação de poros na membrana, ainda há uma significativa atividade antimicrobiana (BREUKINK & DE KRUIJFF, 2006; HASPER *et al.*, 2006).

Nesse contexto, a proteômica tem sido uma das abordagens importantes para entender fenômenos celulares distintos. Através da observação do repertório de proteínas de um determinado organismo, é possível obter dados valiosos não somente para complementar outros estudos ômicos (genômica, transcritômica, etc.), mas também para estudos prospectivos de possíveis alvos de interesse farmacológico, para compreender diferentes mecanismos de adaptação e resposta a estímulos externos (DE HOOG & MANN, 2004). Nesta última aplicação, é possível verificar, através da comparação entre duas condições distintas, de que maneira algumas proteínas diferencialmente expressas estão relacionadas com estímulos ambientais (temperatura, pH, presença de componentes nocivos à integridade celular, etc.), fornecendo-nos um panorama da condição celular naquela determinada situação.

Dessa forma, este trabalho visa a realizar uma abordagem proteômica para estudar a resposta de *L. monocytogenes* frente a concentrações subletais de nisina, a fim de compreender todos os possíveis processos celulares bacterianos que podem estar direta ou indiretamente influenciados pela presença do peptídeo. Como grande parte dos estudos envolvem diretamente estudos funcionais de interação entre nisina e lipídio II (BRÖTZ & SAHL, 2000; ASADUZZAMAN & SONOMOTO, 2009), uma visão mais abrangente do processo de estresse celular pode nos indicar proteínas envolvidas com processos cruciais para a compreensão do mecanismo de ação, o que pode sugerir novas perspectivas de estudos acerca do tema, além de confirmar ou questionar os trabalhos previamente realizados.

2.1 Objetivos específicos

- Determinar a concentração subletal de nisina para os ensaios proteômicos;
- Comparar o repertório de proteínas expressas em condições tratadas e não tratadas com nisina em cepas de *L. monocytogenes*;
- Analisar as proteínas consideradas como diferencialmente expressas para identifica-las no que tange a sua localização, função e processos celulares envolvidos.

3. Materiais e métodos

3.1 Cultivo e determinação da curva de crescimento em *Listeria monocytogenes*

Para o cultivo de *L. monocytogenes* foi escolhida a cepa ATCC 7644, oriunda de um isolado clínico (sorotipo 1/2c) inicialmente cultivada em placa de Petri contendo meio ágar BHI (infusão de coração e cérebro bovino), incubadas a 37°C por 24 h. A seguir, algumas colônias foram retiradas e ressuspensas em solução salina (NaCl 0,9%) estéril para obter uma OD 600 nm de 0,150 e, em seguida, inoculado um volume de 10 µL dessa suspensão em caldo BHI e incubado a 37°C sob 125 rpm para a análise da curva de crescimento por 11 h por meio da leitura da OD a 600 nm em um espectrofotômetro UV Bio-Mate 3 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA).

3.2 Determinação da atividade de nisina

Para a determinação da atividade da nisina, foi solubilizada 10 mg de uma versão comercial de nisina (Nisaplin[®], Danisco, Copenhagen, Dinamarca) em 1 mL de solução de HCl 0,01 M. A partir desta, foram preparadas soluções entre 10⁻³ a 10⁻⁶ mg/mL (diluídas também em HCl 0,01 M) para verificar a curva de crescimento de *L. monocytogenes* tratadas com diferentes concentrações de nisina. Todos os tratamentos foram realizados no mesmo estágio de multiplicação da bactéria (fase *mid-log*). Após o cultivo, foram medidas as absorbâncias no tempo inicial e aos 30 e 60 min após o tratamento. Como controle positivo e negativo, foram utilizadas a solução de nisina a 10 mg/mL e a solução diluente do composto, respectivamente; além de uma amostra sem qualquer tipo de tratamento.

3.3 Extração de proteínas

O protocolo de extração de proteínas foi adaptado de PINTO et al. (2007) e MONTEIRO et al. (2010). Foram realizadas três réplicas biológicas, oriundas de cultivos independentes de *L. monocytogenes* ATCC 7644 para cada condição (tratada ou não tratada). Durante a fase *mid-log* do crescimento bacteriano, os cultivos foram tratados com a concentração subletal de nisina previamente definida. Os controles por sua vez, foram

tratados com solução HCl 0,01 M. Uma hora após o tratamento, as amostras foram retiradas e centrifugadas a 7500 rpm durante 5 min, o sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado 5 vezes com solução de Tris-HCl 20 mM pH 8,0. A seguir, as amostras foram submetidas a 6 ciclos de sonicação de 30 s em banho de gelo (Vibra Cell™ VC601, Sonics and Materials Inc., Newtown, Connecticut, EUA) com intervalos de 1 min entre ciclos e estocadas a -20°C. Todas as amostras de extrato proteico (tratadas e não tratadas) foram quantificadas por meio da análise por fluorescência do kit *Qubit*® *Protein Assay* (Invitrogen/Life Technologies, Grand Island, New York, EUA) e lidos em um fluorômetro *Qubit*® 2.0 *fluorometer* (Invitrogen/Life Technologies).

3.4 Espectrometria de massas

3.4.1 Preparação das amostras

Para a análise dos extratos proteicos obtidos pelos cultivos celulares, inicialmente as amostras foram tratadas com o surfactante Rapigest® SF (Waters, Milford, Massachusetts, EUA). Após isso, as amostras foram tratadas com DTT 5 mM (Bio-Rad, Hercules California, EUA), incubadas a 60°C por 30 min e resfriadas em temperatura ambiente. Para a alquilação das proteínas foi utilizado iodoacetamida 15 mM (Bio-Rad), sendo incubadas a temperatura ambiente por 30 min e aquecida em um termobloco a 100°C por 5 min. Com a amostra resfriada, foi adicionada a enzima Trypsin Gold Mass Spectrometry Grade (Promega, Madison, Wisconsin, EUA) solubilizada em NH₄HCO₃ 200mM pH 7.8 (em volume correspondente a uma proporção de 1 µg para cada 50 µg de extrato proteico) e incubadas a 37°C *overnight*. Por fim, foi adicionado ácido trifluoroacético (TFA) 0,5% (v/v) para a remoção do surfactante (Rapigest SF), incubadas a 37°C por 45 min, centrifugadas a 13000 rpm por 10 min, descartado o precipitado, e o sobrenadante secado em *Speed-Vac*.

As amostras foram ressuspensas em solução de TFA 0,1% e aplicadas em uma coluna de fase reversa (Oasis HLB Cartridge, Waters) para a dessalinização, na qual foram utilizadas como tampão de lavagem e de eluição TFA 0,1% e acetonitrila 50% + TFA 0,1%, respectivamente. A seguir, os produtos das eluições foram separados para a análise direta do extrato bruto e a outra parte (das quais foram utilizadas duas réplicas para cada

condição) foi submetida a um processo de fracionamento por coluna de troca catiônica forte (SCX Minispin Column, Harvard Apparatus, Holliston, Massachusetts, EUA), na qual foram usados um gradiente de eluição de cinco concentrações de KCl (20,40,60,80 e 500 mM). Cada fração eluída foi posteriormente passada por uma coluna de fase reversa (C18 Minispin Column, Harvard Apparatus), para a remoção dos sais que compunham a solução eluente. As amostras foram secadas em *Speed-Vac* e guardadas em refrigeração por -20°C até seu uso.

3.4.2 Análise das amostras por LC-MS/MS

Os peptídeos das frações da SCX, bem como dos extratos totais, foram analisados no espectrômetro de massas ESI-Q-TOF Premier (Waters) acoplado a um sistema de cromatografia líquida de ultra eficiência (UPLC) nanoACQUITY™ (Waters) no Laboratório Nacional de Biociências (LNBio), do Centro Nacional de Pesquisa de Engenharia e Materiais (CNPEN), Campinas/São Paulo. Dez microgramas de peptídeos de cada amostra/fração, solubilizados em ácido fórmico 0,1%, foram fracionados em coluna de fase reversa utilizando um gradiente de 50 a 90% de acetonitrila em ácido fórmico 0,1% durante 60 min, em um fluxo de 200 nL/min. Os espectros em MS foram obtidos na faixa de massa de 100 a 2000 m/z , com tempo de busca de 1 s e intervalos de 0,1 s. Os espectros em MS/MS foram adquiridos na faixa de massa de 50 a 2000 m/z e com tempos de busca e intervalo iguais aos do modo MS. As amostras foram analisadas em modo *Data Dependent Acquisition* (DDA), nas quais cada análise completa em modo MS foram seguidas de 3 análises consecutivas em modo MS/MS, sendo selecionados para fragmentação os 3 íons mais intensos com múltiplas cargas e acima de um ponto de corte de 30 contagens por segundo. As energias de colisão para a fragmentação dos peptídeos foram ajustadas de acordo com os arquivos de reconhecimento de cargas para os íons peptídicos +2, +3 e +4 fornecidos pelo sistema MassLynx (Waters). Os dados brutos de MS/MS foram processados utilizando o Mascot Distiller versão 2.2.1. As amostras foram analisadas em duas réplicas técnicas e, após a corrida de cada réplica biológica a coluna foi lavada com acetonitrila 98% a fim de evitar a mistura dos componentes.

3.4.3 Análise de dados de LC-MS/MS

Para a análise dos dados de MS foram utilizadas as sequências de aminoácidos da cepa FSL R2-561 (cujo sorotipo – 1/2c – é correspondente à cepa na qual foram realizados os testes), disponível pelo *website* da *Broad Institute of Harvard* (Boston, Massachusetts, EUA)(http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/listeria_group/MultiDownloads.html). Também foram incluídas sequências de possíveis contaminantes de amostra (tripsina, queratina humana, dentre outros) junto ao arquivo *.fasta obtido para evitar erros de detecção.

Após a análise das amostras por LC-MS/MS, os dados brutos foram coletados e passados pela plataforma Mascot (Matrix Science, Boston, Massachusetts, EUA), utilizando como parâmetros fixos a carbamidometilação e a oxidação da metionina como modificação variável. Deste resultado, os arquivos resultantes foram exportados na extensão *.dat e processados no *software* Scaffold Q+ versão 3.00.03 (Proteome Software, Portland, Oregon, EUA), utilizando como critérios de seleção a presença de no mínimo dois fragmentos de peptídeos e uma taxa de 95% de probabilidade de identificação da proteína. As proteínas resultantes e comuns entre as amostras de extrato bruto e as fracionadas por SCX foram submetidas ao teste pareado de Wilcoxon através do *software* Graphpad Prism versão 6.02 (Graphpad Software, La Jolla, Califórnia, EUA) para verificar as diferenças das contagens espectrais totais entre as duas abordagens em cada réplica biológica. As amostras que possuíram valores de $p < 0,05$ foram consideradas estatisticamente significativas e, portanto, apresentam diferenças entre si. Em seguida, os dados resultantes foram analisados por contagem espectral total com normalizador e utilizado o teste t para a comparação estatística. Todos os valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos, sendo selecionados para as análises posteriores de ontologia gênica (GO).

3.4.4 Classificação funcional das proteínas identificadas

Para categorizar as proteínas identificadas por LC-MS/MS, foram realizadas análises por GO com o auxílio do programa Blast2GO (BioBam, Valencia, Espanha), nas quais foram verificadas todas as proteínas identificadas e selecionadas pelo Scaffold, a fim de verificar a representatividade do ensaio em comparação à totalidade do genoma bacteriano, bem como a análise separada das proteínas diferencialmente expressas. Para isso, essas sequências foram selecionadas com o auxílio do programa Bioedit versão 7.1.7 (Ibis Biosciences, Carlsbad, California, EUA) a partir do arquivo *.fasta do banco de dados de *L. monocytogenes* FSL R2-561 criado previamente. As análises iniciais envolvem o alinhamento (via Blastp) das sequências de aminoácidos e o mapeamento delas nos termos de GO. A partir disso, é possível ver aas quais processos, funções e componentes celulares as proteínas analisadas estão associadas. Além disso, o programa Blast2GO permite a identificação das proteínas em rotas celulares disponíveis pelo KEGG, contribuindo para a elucidação de possíveis mecanismos celulares envolvidos.

3.4.5 Determinação da atividade da catalase por decaimento do peróxido de hidrogênio (H₂O₂)

Para a determinação da atividade da catalase foi utilizado um protocolo adaptado de BERGMAYER (1983). Inicialmente, foi preparada uma solução de NaH₂PO₄ 50 mM pH 7,0 e uma solução de H₂O₂ cuja absorvância a 240 nm esteja na faixa de $0,85 \pm 0,02$. Após isso, as amostras foram preparadas e diluídas em tampão fosfato a uma proporção de 1:100 (v/v). Ao serem misturadas com a solução de H₂O₂ em uma cubeta de quartzo e incubadas à temperatura ambiente por 5 minutos as amostras foram lidas em um espectrofotômetro UV Bio-Mate 3 (Thermo Fisher Scientific) com comprimento de onda de 240 nm. Durante 5 minutos, as absorvâncias foram medidas com intervalos de leitura de 10 s cada. Para cada amostra foram realizadas triplicatas técnicas e para a solução branca, foi utilizado 1 mL de tampão fosfato mais 0,5 mL de solução de H₂O₂. As leituras foram passadas para uma tabela e os valores plotados em um gráfico OD₂₄₀ x tempo e, a partir de um intervalo estabelecido, determinou-se a atividade da catalase (em U/mL) de acordo com a equação abaixo descrita:

$$\text{Atividade catalase (U/mL)} = \frac{(\Delta A_{\text{Amostra}} - \Delta A_{\text{Branco}}) \times 1,5 \times \text{Fator de diluição}}{0,0436(\text{Coeficiente de extinção molar do H}_2\text{O}_2)}$$

Os valores obtidos foram analisados estatisticamente por meio do teste t não pareado por meio do software *Graphpad Prism*, considerando valores de $p < 0,05$ como estatisticamente significativos.

4. Resultados

4.1 Determinação da curva de crescimento padrão de *Listeria monocytogenes* ATCC 7644

Para verificar a curva de crescimento bacteriano da cepa de *L. monocytogenes* ATCC 7644 foram observados, em triplicatas realizadas em três eventos independentes, os valores das absorbâncias a 600 nm durante 12 h, conforme ilustra a Figura 4:

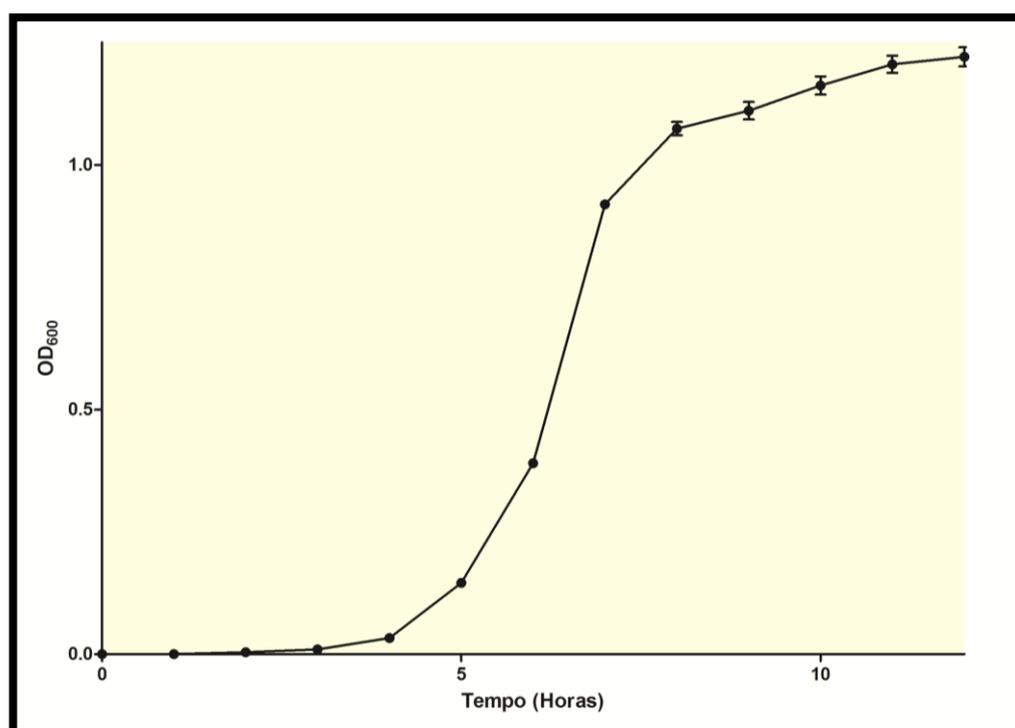


Figura 4 – Gráfico da curva de crescimento de *L. monocytogenes* ATCC 7644

A partir deste perfil, observou-se que os cultivos bacterianos atingiram a fase *mid-log* no período de 6 h após a inoculação da suspensão bacteriana. Com base nestes resultados, estabeleceu-se que os tratamentos com diferentes concentrações de nisina seriam realizados a partir deste período.

4.2 Determinação da atividade de nisina

Para determinar a concentração subletal de nisina em *L. monocytogenes*, foi realizado um ensaio de crescimento bacteriano com diferentes concentrações de nisina a partir da fase *mid-log*, sendo verificadas suas absorbâncias a 0, 30 e 60 min após o tratamento. A Figura 5 ilustra as absorbâncias obtidas nesses intervalos:

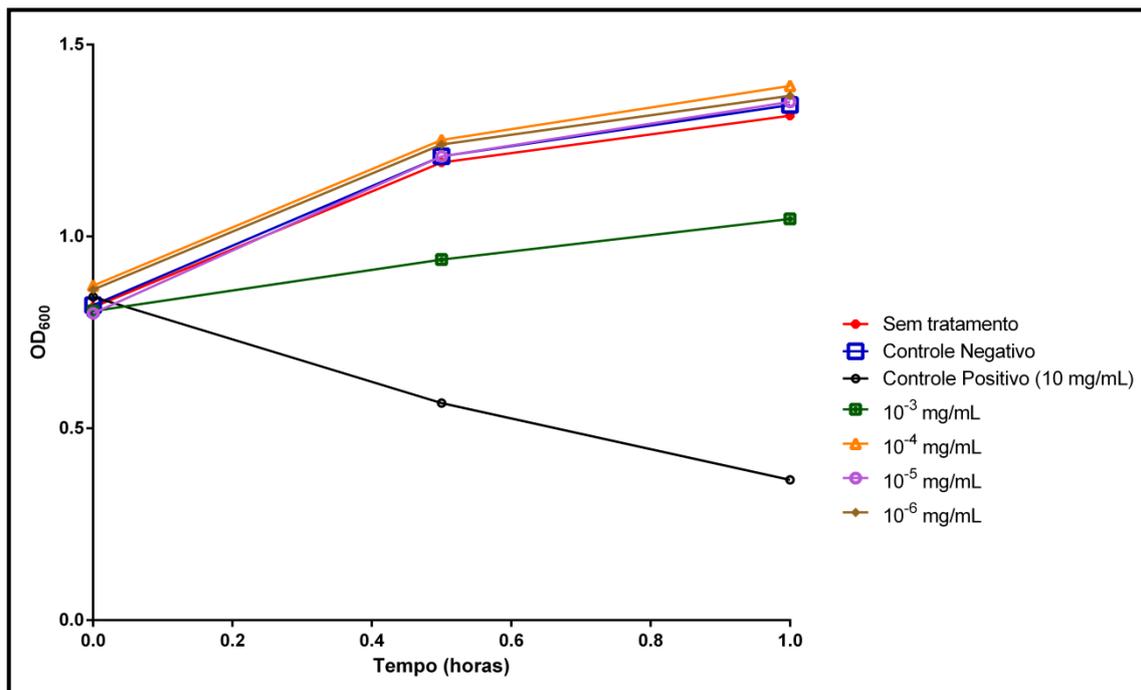


Figura 5- Atividade da nisina em diferentes concentrações após a fase *mid-log* de multiplicação bacteriana.

A partir deste ensaio foi possível verificar que a concentração de 10⁻³ mg/mL possui um perfil de subletalidade mais aproximado para o propósito do trabalho, dada sua capacidade de retardar a multiplicação bacteriana quando comparado as demais concentrações testadas. Em face disto, foi realizada uma curva de crescimento de 8 h, comparando o perfil de crescimento bacteriano de um cultivo tratado (com nisina a 10⁻³ mg/mL) com uma situação não tratada (controle), como mostra a Figura 6:

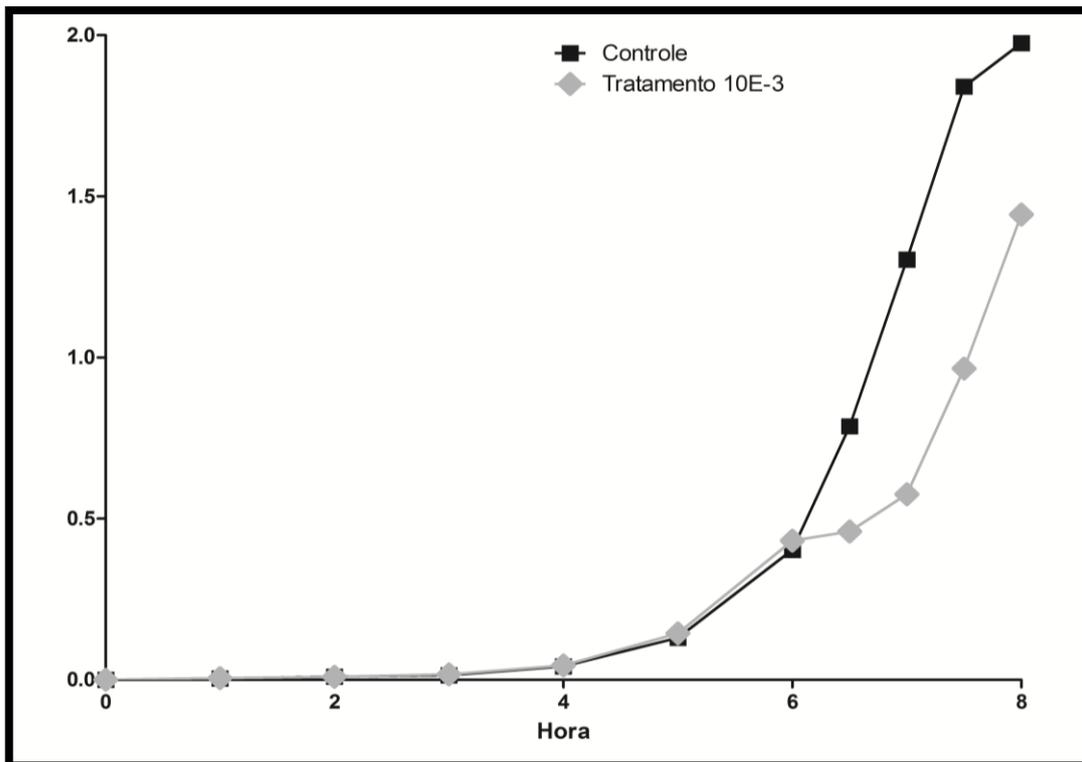


Figura 6 - Curva de crescimento *L. monocytogenes* ATCC 7644 tratado com 10^{-3} mg/mL de nisina

Os dados obtidos deste ensaio nos permitiram observar que, após o tratamento, houve um sutil retardo no crescimento na amostra tratada. Entretanto, uma hora após o tratamento, percebeu-se que houve uma retomada na multiplicação bacteriana. Estes fatos evidenciam que, nesta concentração (10^{-3} mg/mL) não somente ocorreu uma possível atividade inibitória de crescimento, mas também evidenciou a sobrevivência do cultivo bacteriano. Logo, foi determinado a concentração de 10^{-3} mg/mL de nisina como sendo ideal para as análises proteômicas.

4.3 Extração de proteínas

Os cultivos de *L. monocytogenes* ATCC 7644 foram retirados após 1 h de tratamento e obtidos seus extratos proteicos conforme descrito anteriormente. Os extratos foram quantificados para estimar as concentrações de proteínas presentes. Conforme a Tabela 2, podemos perceber que há uma maior quantidade de proteínas presentes nas condições controle, fato este que é plausível uma vez que as amostras tratadas com nisina apresentaram uma sutil inibição no crescimento exponencial bacteriano.

Tabela 2 - Concentrações de proteínas nos extratos celulares de *L. monocytogenes* ATCC 7644 quantificados por Qubit. As amostras são denominadas de acordo com o tratamento dado (Controle e Tratamento, C e T, respectivamente) e suas réplicas biológicas (CA, CB, CC para os controles e TA, TB e TC para os tratados com nisina).

	Amostra	Réplica	Concentração (µg/mL)	Média (µg/mL)
Controles	CA	CA1	$2,78 \times 10^5$	$2,78 \times 10^5$
		CA2	$2,78 \times 10^5$	
	CB	CB1	$2,72 \times 10^5$	$2,71 \times 10^5$
		CB2	$2,70 \times 10^5$	
	CC	CC1	$2,68 \times 10^5$	$2,57 \times 10^5$
		CC2	$2,46 \times 10^5$	
Tratamentos	TA	TA1	$2,14 \times 10^5$	$2,24 \times 10^5$
		TA2	$2,34 \times 10^5$	
	TB	TB1	$1,92 \times 10^5$	$1,83 \times 10^5$
		TB2	$1,74 \times 10^5$	
	TC	TC1	$2,40 \times 10^5$	$2,24 \times 10^5$
		TC2	$2,08 \times 10^5$	

Para fins comparativos, foi realizada uma eletroforese em gel nativo de poliacrilamida dos extratos proteicos (tratados e não tratados). Como resultado, foram detectadas diferenças bastante sutis das amostras controle em comparação às tratadas com nisina, como mostram as bandas marcadas na Figura 7:

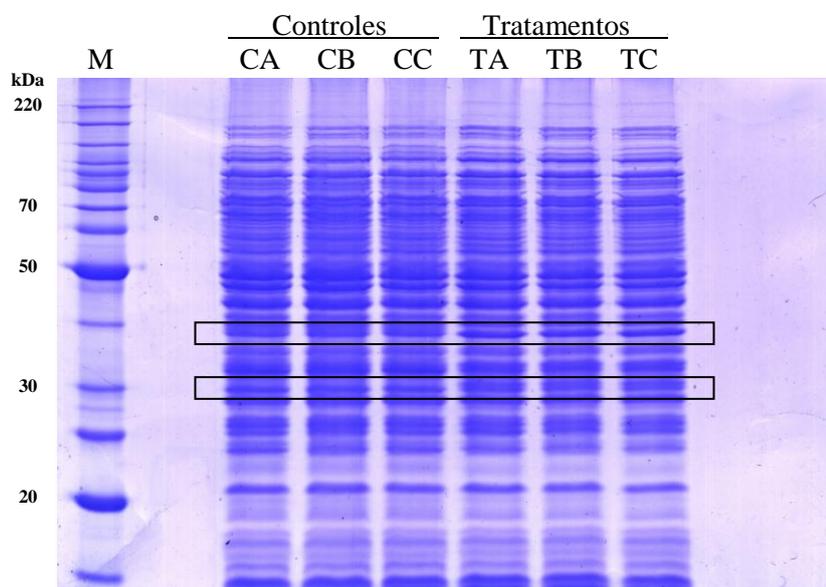


Figura 7 - Gel de poliacrilamida nativo de extratos proteicos de *L. monocytogenes* ATCC 7644 controle e tratadas com nisina a 10^{-3} mg/mL. (CA), (CB) e (CC) representam as réplicas biológicas das amostras controle e (TA), (TB) e (TC) representam as réplicas biológicas das amostras tratadas com nisina. As bandas marcadas na figura representam possíveis diferenças de perfil eletroforético entre as amostras controle e tratadas. **M:** representa o marcador de massa molecular (de 10 a 200 kDa). O gel foi corado com Coomassie R-250.

4.4 Espectrometria de massas

4.4.1 Análise dos dados de LC-MS/MS

Os dados analisados por LC-MS/MS pela plataforma MASCOT permitiram a identificação de 225 e 420 proteínas nas amostras de extrato bruto e por fracionamento em SCX (SCX), respectivamente (Figura 8). Estes valores representam cerca de 14,43% para as amostras de SCX e 7,73% nas amostras de extrato bruto em relação às 2910 proteínas de *L. monocytogenes* presentes no banco de dados utilizado.

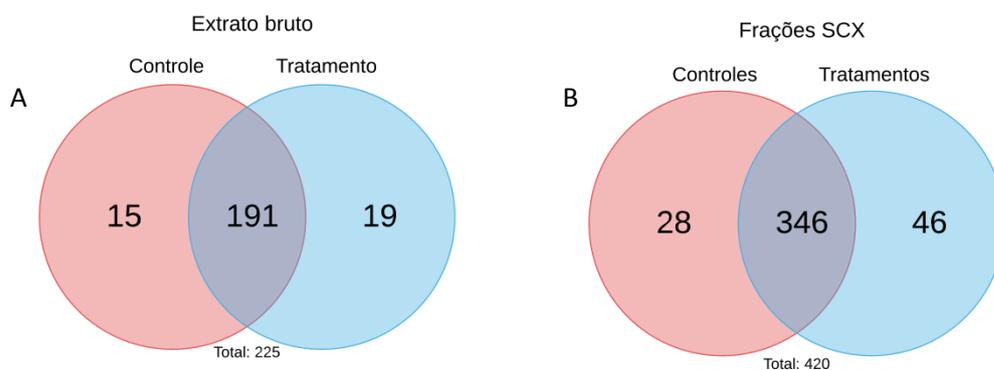


Figura 8 - Diagrama de Venn das proteínas identificadas pela plataforma MASCOT. Em (A) estão representados os dados oriundos do extrato proteico bruto e, em (B), os dados de fracionamento por SCX.

Apesar de possuírem um alto número de proteínas identificadas, muitas delas apresentaram índices de probabilidade de identificação muito baixos. Logo, os dados obtidos foram analisados pelo software Scaffold e critérios adicionais foram escolhidos para selecionar as proteínas para as análises de contagem espectral. Destes critérios, foi estabelecido um mínimo de 95% de probabilidade de identificação de proteínas e o mínimo de 2 peptídeos identificados. Com a adição destes parâmetros, o total de proteínas selecionadas foi de 115 para as amostras de extrato bruto e de 140 para as amostras de SCX (Figura 9). Também foi possível verificar que, em ambos, nenhuma proteína exclusivamente presente na condição controle foi selecionada, indicando que todas as outras identificadas anteriormente possuíam índices não suficientemente fidedignos para as análises.

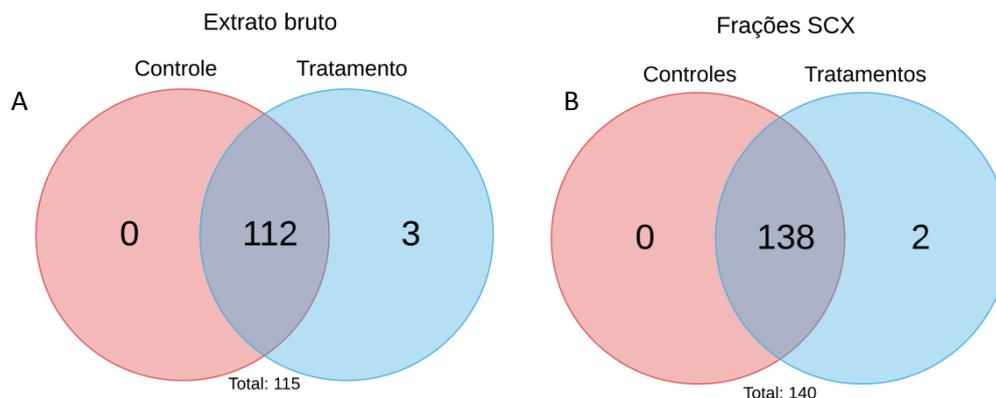


Figura 9 - Diagrama de Venn das proteínas totais selecionadas pelo Scaffold (95% de probabilidade de identificação de proteínas como ponto de corte, e mínimo de 2 peptídeos identificados). Em (A) estão representados os dados oriundos do extrato proteico bruto e, em (B), os dados de fracionamento por SCX.

Para a posterior análise de expressão diferencial de proteínas, inicialmente os dados resultantes de cada abordagem foram comparados entre si com intuito de verificar a similaridade dos resultados. Os dados de extrato bruto e de SCX, respectivamente apresentaram 3 e 37 proteínas exclusivas; e ambos apresentaram 103 proteínas em comum, conforme ilustra a Figura 10. É importante ressaltar que, comparado com os últimos dados obtidos pela seleção dos parâmetros do Scaffold, nos extratos brutos, houve uma defasagem de 10 proteínas em relação aos dados comparativos realizados. Entretanto, isto se deve à exclusão de uma das réplicas biológicas de cada (CC e TC) das amostras de extrato bruto para a comparação das contagens de espectros totais dos dados das amostras de SCX.

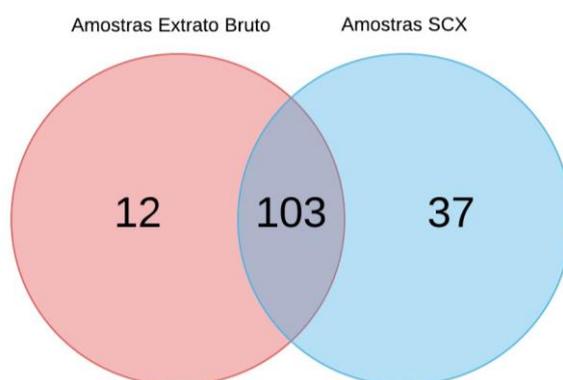


Figura 10 - Diagrama de Venn comparativo entre as proteínas identificadas em comum nos dados de extrato bruto e por fracionamento por SCX

Para verificar as diferenças no nível de espectros totais identificados As 103 proteínas em comum foram submetidas ao teste pareado de Wilcoxon e apresentaram valores de p menores que 0,0001, indicando que, dentre uma mesma réplica biológica, as amostras de extrato bruto de SCX possuem diferenças estatisticamente significativas entre si, fato este que impossibilita a complementariedade dos dados obtidos em ambas as metodologias. Em virtude de possuírem uma maior quantidade de proteínas identificadas, o que significa uma maior representatividade de todo o repertório de proteínas produzidas por *L. monocytogenes* nos diferentes processos celulares, os dados das amostras fracionadas por SCX foram escolhidos para as análises posteriores.

Com o intuito de identificar as proteínas que podem estar diferencialmente expressas quando expostas à nisina, foram analisados os valores de contagem espectrais totais (com normalizador) através do teste t. Como resultado, das 140 proteínas, 18 destas apresentaram diferenças estatisticamente significativas quando comparadas a uma condição controle (não tratada), como mostra a Tabela 3:

Tabela 3 - Proteínas de *L. monocytogenes* em ordem crescente de relevância estatística em relação às amostras tratadas com concentrações subletais de nisina, quando comparadas a uma condição não tratada (controle). As proteínas assinaladas em vermelho correspondem, em relação ao tratamento, às proteínas subexpressas e, em verde, as proteínas superexpressas.

	Nome da proteína	Código de acesso NCBI	Massa molecular	$p < 0,05$
	β -cetoacil - (proteína carreadora de radical acila) sintetase II (414 aa)	LMKG_00108T0 LMKG_00108	44 kDa	0,0014
	RNA polimerase subunidade β (1185 aa)	LMKG_01666T0 LMKG_01666	133 kDa	0,0050
	Aspartil-tRNA sintetase (592 aa)	LMKG_00692T0 LMKG_00692	66 kDa	0,0074
	Proteína Dps (Ferritina não-heme ligante ao ferro) (157 aa)	LMKG_01985T0 LMKG_01985	18 kDa	0,0110
	Enoil-(proteína carreadora de radical acila) redutase (NADH) (263 aa)	LMKG_01955T0 LMKG_01955	28 kDa	0,0140
	Proteína ribossômica S2 (250 aa)	LMKG_00540T0 LMKG_00540	28 kDa	0,0140
	Proteína de montagem de cluster de ferro e enxofre SufD (434 aa)	LMKG_02728T0 LMKG_02728	48 kDa	0,0150
	Anidrase carbônica (234 aa)	LMKG_01061T0 LMKG_01061	27 kDa	0,0150
	Proteína hipotética conservada (602 aa)	LMKG_01158T0 LMKG_01158	66 kDa	0,0200
	Proteína ribossômica da subunidade 30S (126 aa)	LMKG_02870T0 LMKG_02870	14 kDa	0,0210
	Acetato-quinase (406 aa)	LMKG_00624T0 LMKG_00624	45 kDa	0,0260
	Flagelina (288 aa)	LMKG_01192T0 LMKG_01192	30 kDa	0,0260
	Proteína ribossômica S1 da subunidade 30S (382 aa)	LMKG_00395T0 LMKG_00395	41 kDa	0,0270
	Fosfopentomutase (395 aa)	LMKG_00376T0 LMKG_00376	44 kDa	0,0280
	Catalase (489 aa)	LMKG_02049T0 LMKG_02049	56 kDa	0,0300
	Foldase prsA 2 (294 aa)	LMKG_00089T0 LMKG_00089	33 kDa	0,0320
	Proteína grpE (192 aa)	LMKG_00739T0 LMKG_00739	22 kDa	0,0340
	Proteína de divisão celular FtsZ (392 aa)	LMKG_00292T0 LMKG_00292	41 kDa	0,0480

Desta relação de proteínas, vale destacar a presença da catalase, que atua como um protetor contra o dano causado por espécies reativas de oxigênio, além de outras proteínas associadas a respostas mais complexas como a chaperona GrpE, e uma proteína de divisão celular (FtsZ), a qual é uma das responsáveis pela formação do septo de divisão binária bacteriana. Entretanto, devido à diversidade de proteínas que atuam em diferentes processos celulares, é difícil prever um modelo que una a indução da nisina em *L. monocytogenes* com todas as proteínas diferencialmente expressas.

Logo, para entender qual relação destas proteínas no contexto da resposta celular bacteriana frente à nisina, uma das abordagens utilizadas são as ferramentas de bioinformática como o BLAST (para a análise de similaridade das sequências de aminoácidos com proteínas homólogas e ortólogas disponíveis no banco de dados do NCBI) e o *Gene Ontology* (para a identificação dos processos e atividades celulares em que as proteínas estão envolvidas). Com o auxílio destas abordagens, é possível compreender com mais clareza em quais fenômenos celulares as proteínas diferenciais atuam e se sua maior (ou menor) expressão representa, para a célula bacteriana, uma resposta de defesa ou uma consequência ao dano provocado pela nisina.

4.4.2 Classificação funcional das proteínas identificadas

As análises por *Gene Ontology* (através do *software* Blast2GO) inicialmente foram realizadas com todas as proteínas identificadas por LC-MS/MS e selecionadas pelo Scaffold. A partir desta abordagem, foi possível estimar a representatividade da amostra em relação aos diferentes eventos celulares que permeiam a biologia celular de *L. monocytogenes* (Figura 11).

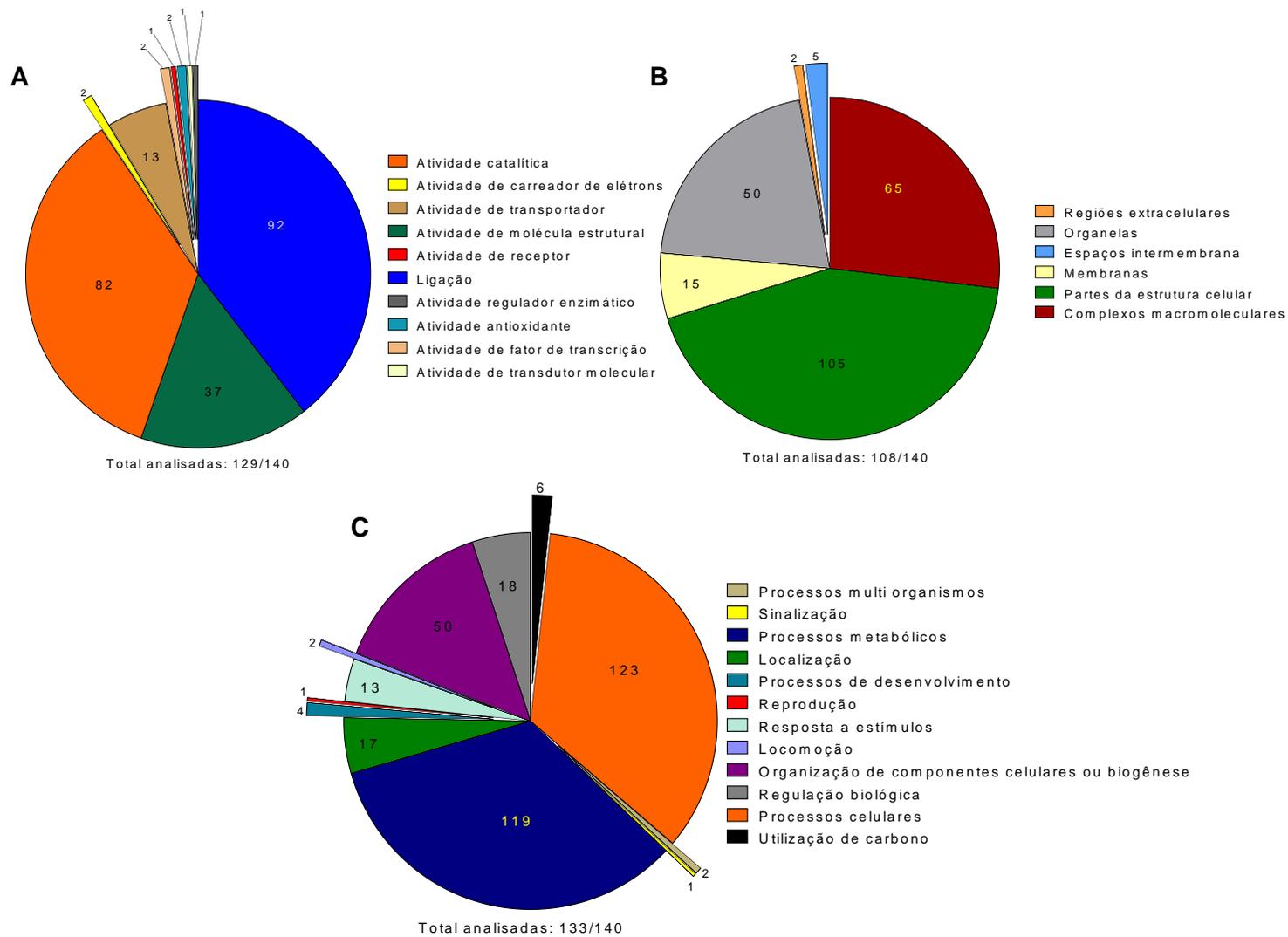


Figura 11 - Gráfico setorial das análises de Gene Ontology das proteínas totais identificadas e selecionadas pelo Scaffold. Os gráficos representam a função (A) e componentes celulares (B) representadas, bem como os processos biológicos (C) envolvidos. Os números representam a quantidade de proteínas que fazem parte de cada seção

Com base nos dados obtidos, foi possível verificar que as proteínas analisadas apresentaram uma boa representatividade por contemplarem grande parte dos processos, componentes e funções celulares. Grande parte delas estão associadas a processos metabólicos (tanto na função de catalisadores ou cofatores enzimáticos), apesar de uma pequena parcela serem responsáveis pelo transporte de compostos e pela formação e estabilidade de complexos moleculares. Também estão envolvidas na locomoção, reprodução, resposta ao estresse celular desencadeados por diferentes estímulos; além de estarem presentes em grande parte das estruturas celulares (incluindo espaços intermembranosos e regiões extracelulares).

A seguir, as proteínas diferencialmente expressas foram analisadas pelo Scaffold. Estas proteínas estão distribuídas na maioria das categorias de GO em relação ao total das proteínas identificadas por LC-MS/MS (Figura 12). Em razão disto, elas parecem ser importantes em diferentes processos metabólicos, atuando na biossíntese de compostos essenciais para a manutenção da vida celular (Figura 13). A expressão positiva ou negativa das proteínas em diferentes processos bioquímicos pode ser crucial para a formação de novos compostos que podem atuar (direta ou indiretamente) na proteção da célula bacteriana ou até mesmo na morte celular, uma vez que esta via metabólica pode ser responsável pela biossíntese de compostos vitais, como por exemplo, alguns tipos de ácidos graxos e bases nitrogenadas.

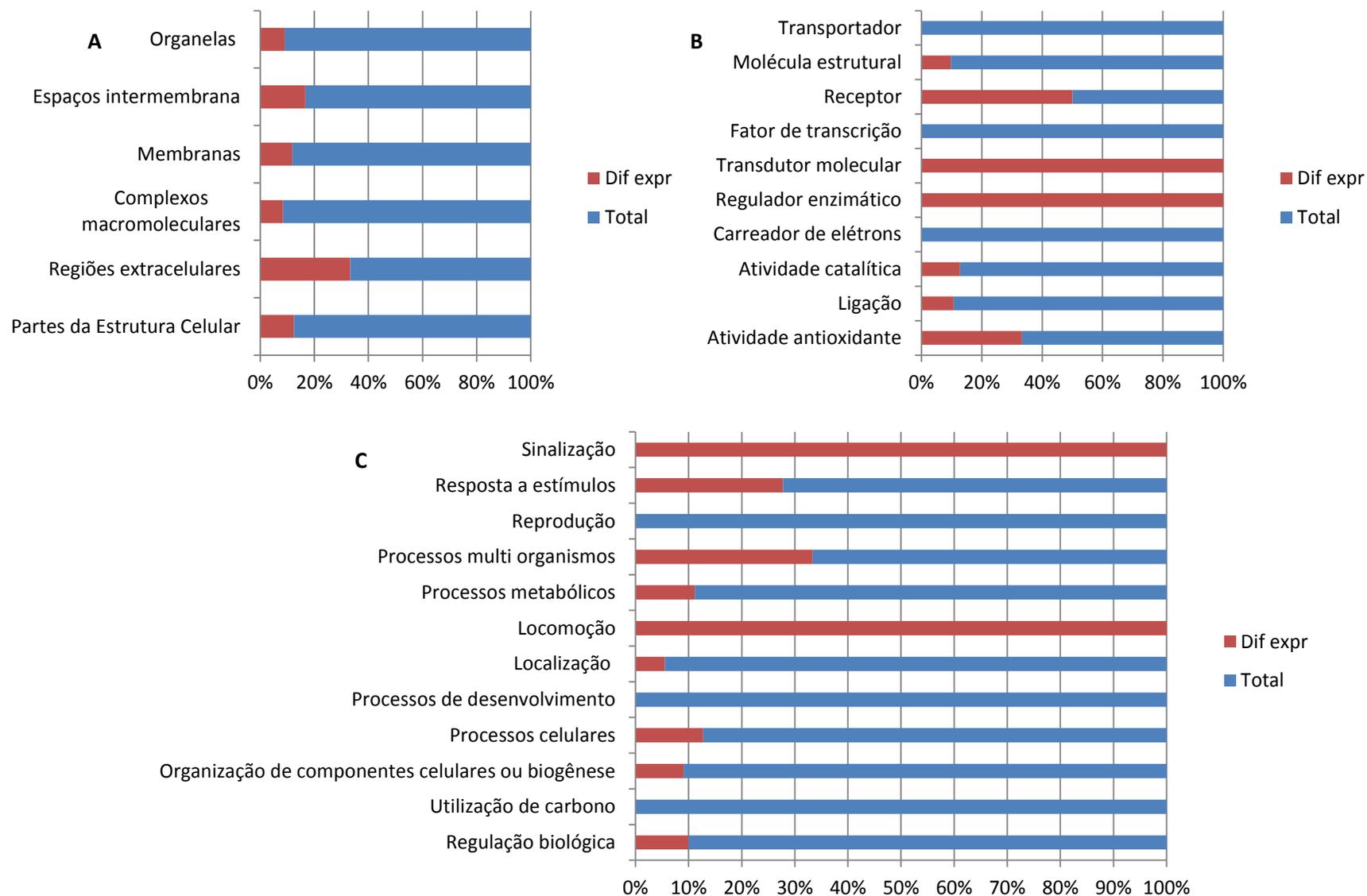


Figura 12 - Comparação das análises dos termos de Gene Ontology entre as proteínas totais e diferencialmente expressas. Em (A) estão representadas a localização celular das proteínas, em (B) as funções desempenhadas e, em (C), os processos biológicos envolvidos. As barras em vermelho representam as proteínas diferencialmente expressas e as barras em azul, as proteínas totais.

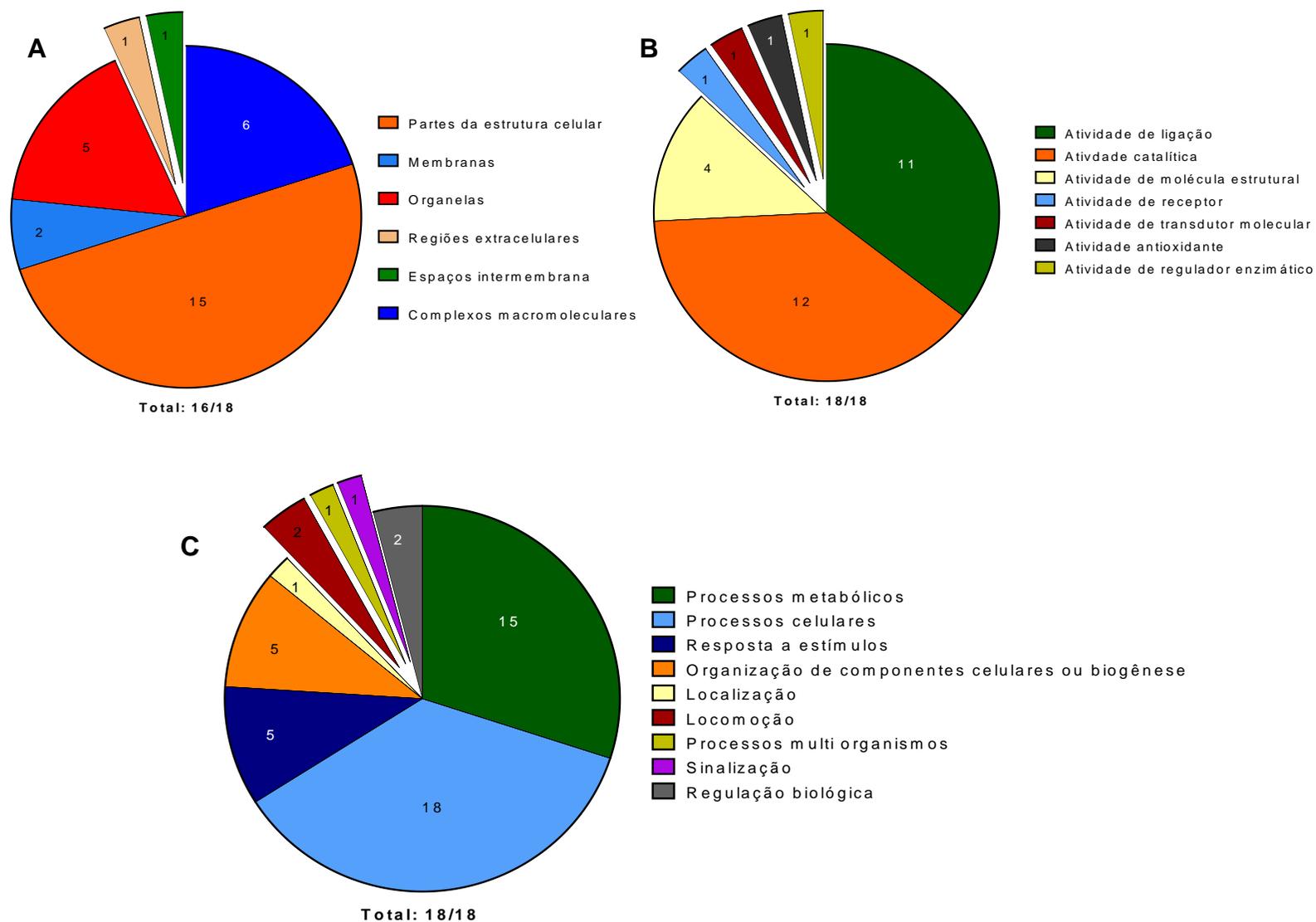


Figura 13 - Gráfico setorial das análises dos termos de Gene Ontology das proteínas analisadas como diferencialmente expressas pelo Scaffold. Os gráficos representam os componentes (A) e funções celulares (B) representadas, bem como os processos biológicos (C) envolvidos. Os números representam a quantidade de proteínas presentes em cada seção

Assim, foi realizado um mapeamento, através do KEGG, das principais vias metabólicas nas quais as proteínas diferenciais estão presentes (Tabela 4). Dentre as proteínas mapeadas, a enzima acetato-quinase foi identificada em diferentes vias bioquímicas, como as do metabolismo de piruvato e propanoato, a via da pentose fosfato, dentre outros. Na biossíntese de ácidos graxos, duas proteínas (enoil-PCA-redutase e β -cetoacil PCA-sintetase II) foram identificadas, as quais são essenciais para a síntese de diversos ácidos graxos saturados. Outras rotas relevantes também são as da biossíntese de aspartil RNAt e o metabolismo de purinas e pirimidinas.

Tabela 4 - Processos metabólicos (identificados pelo Blast2GO através dos dados disponíveis no KEGG) em que algumas proteínas diferenciais estão presentes.

Nome da proteína	Via/Rota	Função	Enzyme Code (EC)
Acetato-quinase	Metabolismo do metano	Fosforila o acetato, transformando-o em acetil fosfato.	EC 2.7.2.1
	Metabolismo do piruvato		
	Metabolismo da taurina/hipotaurina		
	Via da pentose fosfato		
	Metabolismo do propanoato	Fosforila o propanoato, transformando-o em propanoil fosfato.	
Anidrase-carbônica	Metabolismo do nitrogênio	Recicla o CO ₂ formado pela produção de carbamato a partir do cianeto	EC 4.2.1.1
Aspartil-RNAt-sintetase	Biossíntese de aspartil aminoacil tRNA	Liga a L-aspartato com o RNAt-Asp	EC 6.1.1.12
β cetoacil-PCA-sintetase II	Biossíntese de ácidos graxos	Atua na montagem do grupamento acila da PCA com malonil-PCA	EC 2.3.1.179
	Metabolismo da biotina		EC 1.3.1.9
Catalase	Metabolismo do glioxilato e dicarboxilato	Dissocia o H ₂ O ₂ formado pela oxidação de glicolato, fornecendo O ₂ para a própria reação de oxidação do glicolato.	EC 1.11.1.6
	Metabolismo do triptofano	Catalisa a reação de transformação do 3-hidroxi-antranilato em ácido cinabaránico	
	Metabolismo do metano	Auxilia na transformação do metano em formaldeído	
Fosfopentomutase	Metabolismo de purinas	Faz a conversão do grupamento fosfato do carbono 1 para o carbono 5 da ribose	EC 5.4.2.7
	Via da pentose fosfato		
RNA-polimerase subunidade β	Metabolismo de purinas Metabolismo de primidinas	Utiliza os nucleotídeos para a síntese de RNA	EC 2.7.7.6

4.5 Ensaio da atividade da catalase por decaimento do peróxido de hidrogênio (H₂O₂)

Com o intuito de confirmar a expressão diferencial da catalase quando expostos à nisina, foram realizados testes de atividade enzimática pelo decaimento de seu substrato (H₂O₂) durante 5 min. A Figura 11 demonstra o perfil de decaimento do H₂O₂ através dos valores das absorbâncias a 240 nm:

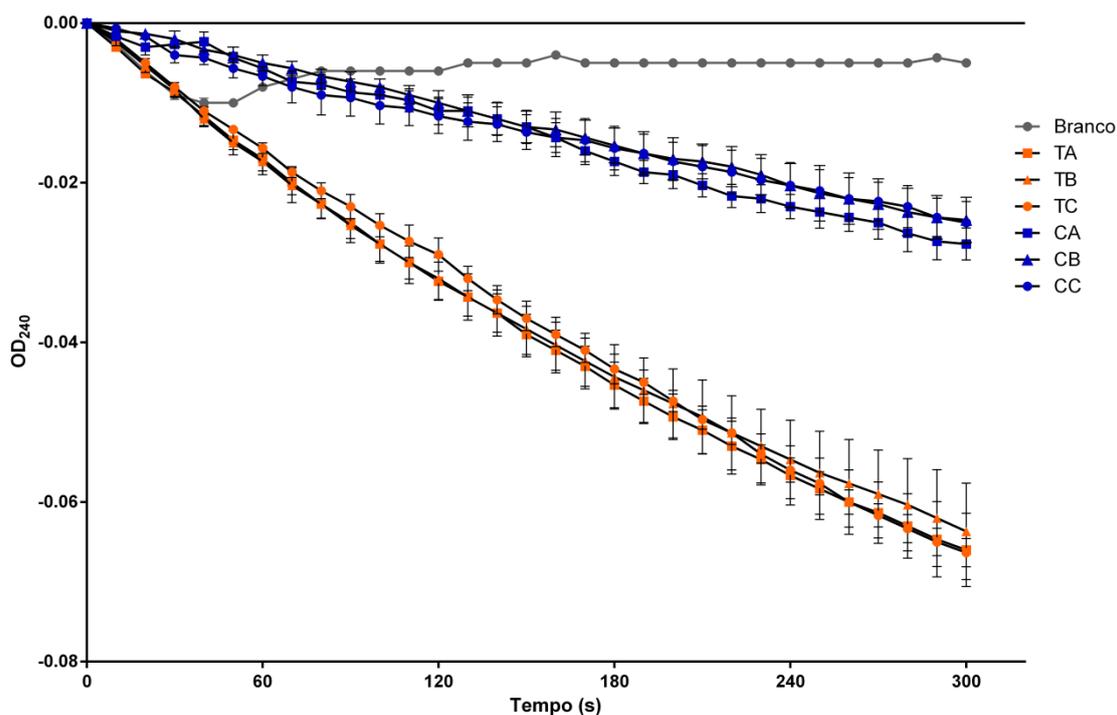


Figura 14 - Gráfico da atividade da catalase pelo decaimento do H₂O₂ durante 5 min. Os pontos em laranja são referentes às amostras tratadas com nisina, em azul, às amostras controles (não tratadas) e, em cinza, aos valores da solução em branco. Cada ponto é equivalente a média de três réplicas técnicas de uma réplica biológica e as barras verticais correspondem ao erro padrão da média de cada ponto.

Os resultados preliminares, demonstrados no gráfico acima, apontam para uma significativa diferença entre as amostras tratadas com nisina em relação às amostras controle. Para determinar quantitativamente a atividade enzimática da catalase nas amostras tratadas e não tratadas, foram selecionados o intervalo de tempo entre 170 s e 230 s (entre 2 min 50 s e 3 min 50 s), devido à menor variação da absorbância das amostras em branco. Com isto, as amostras calculadas (de acordo com a equação previamente mencionada no item 3.4.5) obtiveram valores, em U/mL, de acordo com a Tabela 5:

Tabela 5 - Atividade da catalase, em U/mL, nas condições tratadas e não tratadas com nisina

Réplica	Controle	Tratamento
A	20,64220	40,13761
B	16,05505	36,69725
C	17,20183	44,72477

A partir dos resultados obtidos, foi realizada uma análise estatística, na qual o valor de p entre as amostras controles e tratadas foram equivalentes a 0.0011, evidenciando uma diferença significativa entre ambas as condições. Logo, a análise da atividade enzimática da catalase corrobora com os resultados obtidos por LC-MS/MS, evidenciando uma maior presença quantitativa da enzima nas amostras tratadas, o que implica, por conseguinte, um maior número de moléculas de H_2O_2 dissociadas em um determinado período.

5. Discussão

Os estudos acerca dos mecanismos de resposta e defesa de *L. monocytogenes* frente à nisina têm se concentrado nos processos de interação do peptídeo com o lipídio II, cujos complexos formam poros na membrana, provocando, dessa forma, a morte celular pela perda de eletrólitos e de componentes essenciais para a sobrevivência da bactéria. Entretanto, estudos funcionais de híbridos da nisina com outros lantibióticos não formadores de poros pela interação com o lipídio II, evidenciam possíveis mecanismos alternativos de dano celular (HASPER *et al.*, 2006; SMITH *et al.*, 2008; PAIVA; BREUKINK & MANTOVANI, 2011). Além disso, pouco se sabe sobre os efeitos provocados pela ação da nisina no microrganismo. Neste contexto, a abordagem proteômica empregada neste trabalho objetivou detectar proteínas envolvidas com processos de resposta celular frente à nisina, bem como seus possíveis mecanismos de defesa, as quais podem ser decisivas para a sobrevivência e retomada da multiplicação bacteriana dos cultivos tratados.

Uma das consequências da formação de poros é a perda de controle no fluxo de eletrólitos na célula. Isto pode acarretar na reatividade de alguns elétrons livres com o oxigênio, formando íons superóxido (O_2^-) e moléculas de H_2O_2 além das presentes extracelularmente. Altas taxas de peróxido de hidrogênio podem ser nocivas à célula quando reagem com íons de ferro divalente (denominada reação de Fenton, ilustrado na Figura 15) presentes na forma livre ou ligados a outros compostos, como *clusters* de ferro e enxofre (Fe-S) (ROCHE *et al.*, 2013). Desta reação, são formados radicais hidroxila e íons de ferro III (Fe^{3+}), que são potenciais mutagênicos quando moléculas de H_2O_2 reagem com átomos de ferro associados ao DNA, provocando tanto quebras nas sequências de nucleotídeos como mudanças estruturais nos ácidos nucleicos e açúcares dos nucleotídeos (HENLE & LINN, 1997).

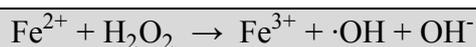


Figura 15 - Equação de Fenton de reação do peróxido de hidrogênio com o íon ferroso

Para evitar os efeitos da reação de Fenton na estrutura do DNA, a célula bacteriana possui inúmeros mecanismos de defesa ao estresse oxidativo (IMLAY, J. A., 2003; IMLAY, J. A., 2008). Grande parte dos organismos procariotos, incluindo a *L. monocytogenes*, possuem sistemas de detecção de compostos que auxiliam ou participam de reações formadoras de EROs, que ao serem ativadas, estimulam a

produção de diferentes enzimas antioxidantes. A catalase é uma das enzimas antioxidantes mais conhecidas, sendo responsável pela dissociação do H_2O_2 em moléculas de H_2O e O_2 , evitando, assim, sua reação com átomos de Fe^{2+} livres na célula bacteriana (CHELIKANI; FITA & LOEWEN, 2004; IMLAY, J. A., 2008). Logo, um acréscimo na expressão desta enzima, como demonstra a possível presença de maiores quantidades de H_2O_2 ou de demais EROs, corroborada também pelos ensaios enzimáticos realizados.

Apesar de serem altamente reativos com o H_2O_2 , os átomos de ferro são vitais na composição de inúmeras proteínas envolvidas com vias metabólicas e processos de virulência (ANDREWS; ROBINSON & RODRÍGUEZ-QUIÑONES, 2003). Devido à predominância de ambientes ricos em oxigênio, os íons e moléculas de ferro presentes estão na forma trivalente (sua forma mais oxidada), os quais são insolúveis a pH fisiológico (PESEK *et al.*, 2011). Logo, para sua captação, enzimas são necessárias para a redução destes íons para sua forma mais solúvel (Fe^{2+}). Para sua posterior incorporação na estrutura das proteínas, nas quais a maioria utiliza o metal em sua forma trivalente, os íons Fe^{2+} serão oxidados através de processos catalíticos (ANDREWS; ROBINSON & RODRÍGUEZ-QUIÑONES, 2003). Entretanto, uma vez em sua forma mais reduzida, os íons Fe^{2+} presentes no citoplasma necessitam de sistemas de proteção da reação de Fenton com o H_2O_2 , auxiliando na correta ligação do metal nas proteínas.

Assim, muitos organismos possuem proteínas sequestradoras de átomos de Fe^{2+} , como as ferritinas, responsáveis pela proteção destes átomos contra a presença de agentes formadores de EROs. Em condições de estresse oxidativo, uma família de proteínas interessantes são as Dps cuja função, além de comportar átomos de ferro, também possuem sítios de ligação ao DNA, protegendo contra os efeitos de radicais livres na sua estrutura (CHIANCONE & CECI, 2010).

Outro grupo de proteínas constituídas por átomos de ferro em sua estrutura e que apresenta extrema relevância na biologia celular de procariotos são as proteínas com *clusters* de ferro e enxofre (Fe-S). Este grupo possui diversas funções celulares, dentre as principais estão a regulação da expressão gênica (através da sensibilidade nas alterações das condições intracelulares ou ambientais), além de servirem como fonte de transferência de elétrons (ao mudar seus estados oxidativos de Fe^{+2} para Fe^{+3} ou vice-versa) em diversas reações bioquímicas na célula (LILL, 2009; SHEPARD *et al.*, 2011; ROCHE *et al.*, 2013). Dentro desta última característica, a troca entre estados iônicos

pode ser operada pela presença de H_2O_2 ou O_2^- , formando radicais livres, além de alterar a composição do *cluster* de Fe-S, que, por conseguinte, modifica suas funções originais designadas (PY; MOREAU & BARRAS, 2011).

Portanto, dentro do contexto do estresse oxidativo provocado pela nisina, é possível realizar algumas inferências sobre possíveis mecanismos de resposta e defesa da *L. monocytogenes* contra a formação de EROs e de agentes oxidantes. A presença de proteínas Dps superexpressas neste estudo nos revela um mecanismo de proteção contra a presença de H_2O_2 presente na célula, indicando que a sobrevivência da célula pode estar associada a menor quantidade de íons Fe^{2+} livres para a reação de Fenton. Além disso, outros estudos também indicam uma atividade de captura de átomos de H_2O_2 e sua possível função de impedir a dispersão de radicais livres formados no interior da proteína para o citoplasma, por meio de resíduos de triptofano e tirosina próximos do sítio de ligação/oxidação do metal (BELLAPADRONA *et al.*, 2010). Juntamente com a atividade aumentada da catalase na célula (em relação à condição controle), os dados apontam para um possível controle na presença de moléculas de H_2O_2 e de íons Fe^{2+} livres, reduzindo potenciais danos oxidativos e garantindo a manutenção de processos celulares vitais para a sobrevivência e multiplicação bacteriana.

Outro mecanismo de estresse celular evidenciado neste estudo é através da superexpressão de uma proteína de choque térmico (grpE), integrante de um complexo de HSPs (formado pelas proteínas GrpE, DnaK e DnaJ) responsáveis por auxiliar na reestruturação da conformação final de proteínas danificadas (RICHTER; HASLBECK & BUCHNER, 2010). Entretanto, segundo SUGIMOTO *et al.* (2008), um aumento significativo na diferença entre as proteínas GrpE e DnaK/DnaJ pode interferir na atividade de remodelamento das proteínas avariadas devido à perda no equilíbrio entre a mudança de estado de maior para menor afinidade de ligação da DnaK com as proteínas desnaturadas. Outra consequência apontada pelo autor é sua influência na divisão celular. Uma das hipóteses levantadas é a influência da ação deste complexo na atividade da proteína FtsZ, principal responsável pela formação do septo de divisão celular. Neste mesmo estudo, cepas submetidas a uma superexpressão de GrpE apresentaram um sutil atraso no seu crescimento quando comparadas a cepas controle. Entretanto, para compreender a real atividade deste complexo quando submetidas a concentrações subletais de nisina, é necessário estimar a expressão de DnaK e DnaJ para avaliarmos a atividade de chaperona do complexo, a qual não foi possível devido a não identificação da proteína nas análises por espectrometria de massas.

Quanto aos aspectos metabólicos, algumas vias bioquímicas no microrganismo merecem atenção. Conforme ilustrado nos resultados, foi evidenciado uma baixa expressão de acetato quinase (AckA). Alguns autores acreditam que isto pode ser explicado pela baixa concentração de fontes de carbono (como glicose e outros açúcares), sendo necessário manter os níveis de acetil-CoA, que, por conseguinte, dará origem a outros metabólitos necessários para a célula bacteriana (WAITE; SIRAGUSA & HUTKINS, 1998; SHIVERS; DINEEN & SONENSHEIN, 2006).

Outro fator a ser considerado é a importância do composto acetil fosfato em diversos processos celulares. Estudos realizados mostram uma grande correlação entre níveis de acetil fosfato com a atividade de algumas chaperonas. Isto pode indicar uma possível atividade, ainda que de maneira indireta, do composto no correto dobramento de proteínas, possivelmente por grande parte das chaperonas serem ATP dependentes (MIZRAHI; BIRAN & RON, 2009). A presença de acetil fosfato também contribui para o aumento da expressão de proteínas relacionadas com a motilidade, como flagelinas, por exemplo. Esta afirmação vai ao encontro dos dados obtidos neste estudo, haja vista a superexpressão de flagelina evidenciada nos resultados de MS analisados. Isto ocorre devido à transferência do radical fosfato do composto para a proteína DegU, que ao ser fosforilada, estimula a transcrição de genes codificadores de proteínas envolvidas em processos de motilidade e síntese do flagelo bacteriano (GUERIRI *et al.*, 2008).

No que tange à estrutura celular, sabe-se que a presença da nisina interfere na formação da parede de peptidoglicano ao se ligar com um de seus precursores (lipídio II). Em adição a isto, os resultados obtidos apontam para uma baixa expressão da proteína PrsA2, que além de ser uma chaperona importante na maturação de fatores de virulência (MILOHANIC *et al.*, 2003; ALONZO III *et al.*, 2009; ALONZO III & FREITAG, 2010), também pode estar associada ao correto dobramento das PBPs, essenciais para a ligação dos monômeros de PG na parede celular (HYYRYLÄINEN *et al.*, 2010). Como resultado, a célula é incapaz de manter coesa a estrutura da parede celular, haja vista sua fragilidade tanto em processos de biossíntese e exportação dos monômeros de PG, como em processos de polimerização da parede celular. Autores como HYDE *et al.* (2006) postulam que a presença da nisina pode acelerar o processo de divisão celular (fato esse que explicaria a superexpressão da proteína de divisão celular FtsZ), estimulando a síntese de componentes da parede celular e da membrana plasmática. Contudo, este processo pode provocar, conforme evidenciado no estudo,

processos de multiplicação bacteriana aberrantes, dando origem a células pequenas ou com septos mal formados.

Outro fator interessante é o aumento da expressão de enzimas responsáveis pela biossíntese de ácidos graxos essenciais para a síntese de componentes da membrana celular. Conforme alguns autores, essa produção elevada pode estar associada a um mecanismo alternativo de multiplicação celular primitivo, denominado forma L (LEAVER *et al.*, 2009; MERCIER; KAWAI & ERRINGTON, 2013). Este processo, por ocorrer especialmente em microrganismos deficientes na produção de componentes da parede de PG de alguns microrganismos, pode nos fornecer uma possível resposta em relação à capacidade da *L. monocytogenes* em retomar o crescimento bacteriano mesmo após o tratamento com nisina.

Segundo DELL'ERA *et al.* (2009), a *L. monocytogenes* é capaz de detectar deficiências na produção de precursores de parede celular e estimular a divisão bacteriana por forma L. Embora um estudo realizado indique que formas L de *Bacillus subtilis* sejam sensíveis à nisina (WOLF *et al.*, 2012), as formas L de *L. monocytogenes* possuem uma morfologia bastante peculiar. Elas formam microvesículas intracelulares, fato este que pode ser crucial na sobrevivência celular, uma vez que estas vesículas podem ser essenciais para a proteção dos conteúdos celulares e a manutenção de seus processos metabólicos essenciais para a sobrevivência, ainda que a distribuição dos conteúdos celulares sejam desiguais (BRIERS *et al.*, 2012). Caso esta premissa seja verossímil ao estudo realizado, resta saber se as células, após a formação das vesículas, retomarão ao modo de divisão celular convencional ou permanecerão dividindo-se na forma L.

6. Conclusões e perspectivas

Em face ao apresentado, podemos apontar para alguns possíveis mecanismos celulares interessantes para futuros estudos visando compreender melhor a atividade da nisina sobre *L. monocytogenes*. Conforme esperado, a elevada presença de enzimas como a catalase (evidenciada tanto nas análises por LC-MS\MS, nos permitiram identificar um alto teor de EROs em ambiente intracelular, possivelmente causado pelos poros formados na membrana. Além disso, a presença de proteínas carreadoras de átomos de ferro (Dps) evidencia também uma outra forma de proteção contra reações formadoras de radicais livres, através da proteção de íons Fe^{2+} de moléculas de H_2O_2 .

Paralelamente aos mecanismos de proteção contra EROs, o equilíbrio molecular entre proteínas constituintes do complexo HSP70 pode explicar um dos fatores responsáveis pelo retardo no crescimento bacteriano das amostras tratadas com nisina (em comparação com as não tratadas), visto que isto pode ser influenciado pela atividade de uma importante proteína constituinte do processo de divisão celular (FtsZ). Entretanto, conforme mencionado anteriormente, para corroborar tal afirmação, ainda é necessário avaliar quantitativamente as demais proteínas constituintes do complexo (DnaK e DnaJ).

Quanto às possíveis alterações na parede e membrana celular bacteriana, parece bastante promissor a existência de possíveis mecanismos de divisão celular não convencionais, provavelmente desencadeadas pela má formação e montagem de precursores da parede celular de peptidoglicano. Em razão disso, novas células bacterianas podem ser criadas a partir de divisões não dependentes da proteína FtsZ, entretanto com formas bastante distintas e com conteúdo celulares diferentes. Apesar disso, este processo pode explicar um dos possíveis mecanismos de sobrevivência celular bacteriana, dependendo da concentração de nisina presente. Assim, também será necessário visualizar, via microscopia eletrônica, a morfologia bacteriana pós tratamento para verificar seu modo de multiplicação celular além da estrutura das paredes e membranas celulares. Caso essa premissa seja verdadeira, também é necessário analisar após as horas seguintes, com o intuito de verificar se as células bacterianas são capazes ou não de retomarem ao seu processo de divisão celular convencional.

Portanto, este estudo nos permitiu identificar possíveis novos mecanismos de resposta da *L. monocytogenes* frente à nisina, que podem ser essenciais para auxiliar

questionamentos atuais, tais como respostas celulares não diretamente relacionados ao complexo formado entre nisina e lipídio II. Entretanto, mais estudos confirmatórios são necessários para elucidar os resultados obtidos por LC-MS/MS.

7. Referências Bibliográficas:

ALKHATIB, Z. *et al.* Lantibiotics: how do producers become self-protected? *Journal of biotechnology*, v. 159, n. 3, p. 145–54, 15 jun. 2012.

ALONZO III, F. *et al.* The posttranslocation chaperone PrsA2 contributes to multiple facets of *Listeria monocytogenes* pathogenesis. *Infection and immunity*, v. 77, n. 7, p. 2612–23, jul. 2009.

ALONZO III, F.; FREITAG, N. E. *Listeria monocytogenes* PrsA2 is required for virulence factor secretion and bacterial viability within the host cell cytosol. *Infection and immunity*, v. 78, n. 11, p. 4944–57, nov. 2010.

ANDREWS, S. C.; ROBINSON, A. K.; RODRÍGUEZ-QUIÑONES, F. Bacterial iron homeostasis. *FEMS Microbiology Reviews*, v. 27, n. 2-3, p. 215–237, jun. 2003.

APPLEYARD, A. N. *et al.* Dissecting structural and functional diversity of the lantibiotic mersacidin. *Chemistry & biology*, v. 16, n. 5, p. 490–8, 29 maio 2009.

ARANHA, C.; GUPTA, S.; REDDY, K. V. R. Contraceptive efficacy of antimicrobial peptide Nisin: in vitro and in vivo studies. *Contraception*, v. 69, n. 4, p. 333–8, abr. 2004.

ASADUZZAMAN, S. M.; SONOMOTO, K. Lantibiotics: diverse activities and unique modes of action. *Journal of bioscience and bioengineering*, v. 107, n. 5, p. 475–87, maio 2009.

BACTIBASE Database. Disponível em: <<http://bactibase.pfba-lab-tun.org/main.php>>. Acesso em: 31 mar. 2013.

BARANCELLI, G. V. *et al.* LISTERIA MONOCYTOGENES: OCORRÊNCIA EM PRODUTOS LÁCTEOS E SUAS IMPLICAÇÕES EM SAÚDE PÚBLICA. *Arquivos do Instituto Biológico*, v. 78, n. 1, p. 155–168, 2011.

BARBUDDHE, S. B. *et al.* Epidemiology and risk management of listeriosis in India. *International journal of food microbiology*, v. 154, n. 3, p. 113–8, 15 mar. 2012.

BEGLEY, M. *et al.* Contribution of Three Bile-Associated Loci , bsh , pva , and btlB , to Gastrointestinal Persistence and Bile Tolerance of *Listeria monocytogenes* Gastrointestinal Persistence and Bile Tolerance of *Listeria monocytogenes*. *Infection and immunity*, v. 73, n. 2, p. 894–904, 2005.

BELLAPADRONA, G. *et al.* Dps proteins prevent Fenton-mediated oxidative damage by trapping hydroxyl radicals within the protein shell. *Free radical biology & medicine*, v. 48, n. 2, p. 292–7, 15 jan. 2010.

BERGMEYER, H. U. *Methods of Enzymatic Analysis*. 3. ed. Weinheim, Germany: Verlag Chemie, 1983. p. 273–286

- BIERBAUM, G.; SAHL, H.-G. Lantibiotics: mode of action, biosynthesis and bioengineering. *Current pharmaceutical biotechnology*, v. 10, n. 1, p. 2–18, jan. 2009.
- BONELLI, R. R.; WIEDEMANN, I.; SAHL, H. Lantibiotics. In: KASTIN, A.; KASTIN, A. J. (Org.). *Handbook of Biologically Active Peptides*. 1. ed. Baton Rouge, Louisiana, EUA: Academic Press, 2006. p. 98–105.
- BREUKINK, E.; DE KRUIJFF, B. Lipid II as a target for antibiotics. *Nature reviews. Drug discovery*, v. 5, n. 4, p. 321–32, abr. 2006.
- BRIERS, Y. *et al.* Intracellular vesicles as reproduction elements in cell wall-deficient L-form bacteria. *PloS one*, v. 7, n. 6, p. e38514, jan. 2012.
- BROAD INSTITUTE OF HARVARD; MIT. *Listeria monocytogenes Sequencing Project*. Disponível em: <<http://www.broadinstitute.org>>.
- BROGDEN, K. A. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nature reviews. Microbiology*, v. 3, n. 3, p. 238–50, mar. 2005.
- BRÖTZ, H.; SAHL, H.-G. New insights into the mechanism of action of lantibiotics — diverse biological effects by binding to the same molecular target. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 46, p. 1–6, 2000.
- BRUMFITT, W.; SALTON, M. R. J.; HAMILTON-MILLER, J. M. T. Nisin, alone and combined with peptidoglycan-modulating antibiotics: activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and vancomycin-resistant enterococci. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 50, n. 5, p. 731–734, 20 set. 2002.
- CAMPION, A. *et al.* In vivo activity of Nisin A and Nisin V against *Listeria monocytogenes* in mice. *BMC microbiology*, v. 13, n. 1, p. 23, 1 fev. 2013.
- CDC. *CDC - Listeriosis Infections linked to Marte Brand Frescolina Ricotta Salata Cheese*. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/cheese-09-12/index.html>>. Acesso em: 12 abr. 2013a.
- CDC. *National Enteric Disease Surveillance : Listeria Annual Summary , 2010. .* Atlanta, EUA: [s.n.], 2012b.
- CDC. *National Enteric Disease Surveillance : Listeria Annual Summary , 2011. .* Atlanta, EUA: [s.n.], 2013.
- CHELIKANI, P.; FITA, I.; LOEWEN, P. C. Diversity of structures and properties among catalases. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, v. 61, n. 2, p. 192–208, jan. 2004.
- CHIANCONE, E.; CECI, P. The multifaceted capacity of Dps proteins to combat bacterial stress conditions: Detoxification of iron and hydrogen peroxide and DNA binding. *Biochimica et biophysica acta*, v. 1800, n. 8, p. 798–805, ago. 2010.

COTTER, P. D.; HILL, C.; ROSS, R. P. Bacteriocins : developing innate immunity for food. *Nature reviews microbiology*, v. 3, p. 777–788, 2005.

CRANDALL, A. D.; MONTVILLE, T. J. Nisin Resistance in *Listeria monocytogenes* ATCC 700302 Is a Complex Phenotype. *Appl. Envir. Microbiol.*, v. 64, n. 1, p. 231–237, 1 jan. 1998.

CRUZ, C. D.; MARTINEZ, M. B.; DESTRO, M. T. *Listeria monocytogenes* : um agente infeccioso ainda pouco conhecido no Brasil. *Alimentos e Nutrição*, v. 19, n. 02, p. 195–206, 2008.

DE ARAUZ, L. J. *et al.* Nisin biotechnological production and application: a review. *Trends in Food Science & Technology*, v. 20, n. 3-4, p. 146–154, abr. 2009.

DE HOOG, C. L.; MANN, M. Proteomics. *Annual review of genomics and human genetics*, v. 5, p. 267–93, jan. 2004.

DE VUYST, L.; VANDAMME, E. J. Nisin, a lantibiotic produced by *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis*: Properties, biosynthesis, fermentation and applications. In: DE VUYST, L.; VANDAMME, E. J. (Org.). *Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria: microbiology, genetics, and applications*. 1. ed. Londres, Inglaterra: Blackie Academic & Professional, 1994. p. 151–221.

DELL'ERA, S. *et al.* *Listeria monocytogenes* L-forms respond to cell wall deficiency by modifying gene expression and the mode of division. *Molecular microbiology*, v. 73, n. 2, p. 306–22, jul. 2009.

DRAPER, L. A *et al.* Lantibiotic immunity. *Current protein & peptide science*, v. 9, n. 1, p. 39–49, fev. 2008.

DRIESSEN, A. J. *et al.* Mechanistic studies of lantibiotic-induced permeabilization of phospholipid vesicles. *Biochemistry*, v. 34, n. 5, p. 1606–14, 7 fev. 1995.

DUSSURGET, O.; PIZARRO-CERDA, J.; COSSART, P. Molecular determinants of *Listeria monocytogenes* virulence. *Annual review of microbiology*, v. 58, p. 587–610, jan. 2004.

ECDC. *Annual epidemiological report Reporting on 2010 surveillance data and 2011 epidemic intelligence data 2012*. . Estocolmo, Suécia: [s.n.], 2012.

EFSA. *Trends and Sources of Zoonoses , Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2010*. . Parma, Itália: [s.n.], 2012.

FAO. *Milk production in India - opportunities and risks for small-scale producers*.

Disponível em:

<http://www.fao.org/ag/againfo/programmes/en/pplpi/docarc/pb_wp2.pdf>. Acesso em: 2 fev. 2013.

FIELD, D. *et al.* Bioengineered Nisin A Derivatives with Enhanced Activity against Both Gram Positive and Gram Negative Pathogens. *PloS one*, v. 7, n. 10, p. e46884, jan. 2012.

GEIS, A.; SINGH, J.; TEUBER, M. Potential of lactic streptococci to produce bacteriocin. *Applied and environmental microbiology*, v. 45, n. 1, p. 205–11, jan. 1983.

GOULET, V. *et al.* Increasing incidence of listeriosis in France and other European countries. *Emerging infectious diseases*, v. 14, n. 5, p. 734–40, maio 2008.

GUASCH, J. F. *et al.* Bacteriocin 28b , a chromosomally encoded bacteriocin produced by most *Serratia marcescens* biotypes. *Research in microbiology*, v. 146, p. 477–483, 1995.

GUERIRI, I. *et al.* The Pta-AckA pathway controlling acetyl phosphate levels and the phosphorylation state of the DegU orphan response regulator both play a role in regulating *Listeria monocytogenes* motility and chemotaxis. *Molecular microbiology*, v. 70, n. 6, p. 1342–57, dez. 2008.

GUPTA, S. M. *et al.* Interaction of contraceptive antimicrobial peptide nisin with target cell membranes: implications for use as vaginal microbicide. *Contraception*, v. 80, n. 3, p. 299–307, set. 2009.

HAMON, M. A. *et al.* Listeriolysin O: the Swiss army knife of *Listeria*. *Trends in microbiology*, v. 20, n. 8, p. 360–8, ago. 2012.

HASPER, H. E. *et al.* An alternative bactericidal mechanism of action for lantibiotic peptides that target lipid II. *Science (New York, N.Y.)*, v. 313, n. 5793, p. 1636–7, 15 set. 2006.

HENG, N. C. K. *et al.* The Diversity of Bacteriocins in Gram-Positive Bacteria. In: RILEY, M. A.; CHAVAN, M. A. (Org.). *Bacteriocins: Ecology and Evolution*. [S.l.: s.n.], 2007. p. 45–92.

HENG, N. C. K.; TAGG, J. R. What's in a name? Class distinction for bacteriocins. *Nature Reviews Microbiology*, v. 4, n. 2, 1 fev. 2006.

HENLE, E. S.; LINN, S. Repair of DNA Damage by Iron / Hydrogen Peroxide *. *The Journal of biological chemistry*, v. 272, n. 31, p. 19095–19098, 1997.

HYDE, A. J. *et al.* Nisin-induced changes in *Bacillus* morphology suggest a paradigm of antibiotic action. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 103, n. 52, p. 19896–901, 26 dez. 2006.

HYRYLÄINEN, H. *et al.* Penicillin-binding protein folding is dependent on the PrsA peptidyl-prolyl cis-trans isomerase in *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology*, v. 77, n. 1, p. 108–127, 2010.

IMLAY, J. A. Pathways of oxidative damage. *Annual review of microbiology*, v. 57, p. 395–418, jan. 2003.

- IMLAY, J. A. Cellular Defenses against Superoxide and Hydrogen Peroxide. *Annual reviews of biochemistry*, v. 77, p. 755–776, 2008.
- IRETON, K. *et al.* A role for phosphoinositide 3-kinase in bacterial invasion. *Science (New York, N.Y.)*, v. 274, n. 5288, p. 780–2, 1 nov. 1996.
- JACK, R. W.; TAGG, J. R.; RAY, B. Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Microbiological reviews*, v. 59, n. 2, p. 171–200, jun. 1995.
- JACOB, F. *et al.* Définition de quelques termes relatifs a la lysogénie. *Annales de l'Institut Pasteur*, v. 84, n. 1, p. 222–224, 1953.
- JAMES, R. Molecular cloning and purification of klebicin B. *Journal of general microbiology*, v. 134, n. 9, p. 2525–33, set. 1988.
- JUNG, G. Lantibiotics: a survey. In: JUNG, G.; SAHL, H.-G. (Org.). *Nisin and Novel Lantibiotics*. 1. ed. Leiden, Netherlands: ESCOM Science Publiser, 1991. p. 1–34.
- KAUR, G.; SINGH, T. P.; *et al.* Mechanism of Nisin, Pediocin 34, and Enterocin FH99 Resistance in *Listeria monocytogenes*. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, v. 4, n. 1, p. 11–20, 3 nov. 2011.
- KAUR, G.; MALIK, R. K.; *et al.* Nisin and class IIa bacteriocin resistance among *Listeria* and other foodborne pathogens and spoilage bacteria. *Microbial drug resistance (Larchmont, N.Y.)*, v. 17, n. 2, p. 197–205, jun. 2011.
- KIM, T.-S. *et al.* Antagonism of *Helicobacter pylori* by bacteriocins of lactic acid bacteria. *Journal of food protection*, v. 66, n. 1, p. 3–12, jan. 2003.
- KLAENHAMMER, T. R. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS microbiology reviews*, v. 12, n. 1-3, p. 39–85, set. 1993.
- KOZAK, W.; BARDOWSKI, J.; DOBRZAŃSKI, W. T. Lactostrepcins - acid bacteriocins produced by lactic streptococci. *Journal of Dairy Research*, v. 45, n. 02, p. 247–257, 1978.
- KRAMARENKO, T. *et al.* *Listeria monocytogenes* prevalence and serotype diversity in various foods. *Food Control*, v. 30, n. 1, p. 24–29, mar. 2013.
- LEAVER, M. *et al.* Life without a wall or division machine in *Bacillus subtilis*. *Nature*, v. 457, n. 7231, p. 849–53, 12 fev. 2009.
- LEE, H.; KIM, H. Lantibiotics , Class I Bacteriocins from the Genus *Bacillus*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 21, n. February, p. 229–235, 2011.
- LEMES-MARQUES, E. G.; CRUZ, C. D.; DESTRO, M. T. Pheno- and genotypic characterization of *Listeria monocytogenes* clinical isolates from the southwestern region of the state of São Paulo, Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 38, p. 287–292, 2007.

- LILL, R. Function and biogenesis of iron-sulphur proteins. *Nature*, v. 460, n. 7257, p. 831–8, 13 ago. 2009.
- LOHANS, C. T.; VEDERAS, J. C. Development of Class IIa Bacteriocins as Therapeutic Agents. *International journal of microbiology*, v. 2012, p. 386410, jan. 2012.
- LUNGU, B.; RICKE, S. C.; JOHNSON, M. G. Growth, survival, proliferation and pathogenesis of *Listeria monocytogenes* under low oxygen or anaerobic conditions: a review. *Anaerobe*, v. 15, n. 1-2, p. 7–17, 2009.
- MAISNIER-PATIN, S.; RICHARD, J. Cell wall changes in nisin-resistant variants of *Listeria innocua* grown in the presence of high nisin concentrations. *FEMS Microbiology Letters*, v. 140, n. 1, p. 29–35, 15 jun. 1996.
- MALDONADO-BARRAGÁN, A.; RUIZ-BARBA, J. L.; JIMÉNEZ-DÍAZ, R. Knockout of three-component regulatory systems reveals that the apparently constitutive plantaricin-production phenotype shown by *Lactobacillus plantarum* on solid medium is regulated via quorum sensing. *International journal of food microbiology*, v. 130, n. 1, p. 35–42, 15 mar. 2009.
- MARTINS, E. A.; LEAL GERMANO, P. M. *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat, sliced, cooked ham and salami products, marketed in the city of São Paulo, Brazil: Occurrence, quantification, and serotyping. *Food Control*, v. 22, n. 2, p. 297–302, fev. 2011.
- MATTICK, A. T. R.; HIRSCH, A. Further observations on an inhibitory substance (nisin) from lactic streptococci. *Lancet*, v. 250, n. 6462, p. 5–8, 1947.
- MCKAY, L. L.; BALDWIN, K. A. Applications for biotechnology: present and future improvements in lactic acid bacteria. *FEMS microbiology reviews*, v. 7, n. 1-2, p. 3–14, set. 1990.
- MERCIER, R.; KAWAI, Y.; ERRINGTON, J. Excess Membrane Synthesis Drives a Primitive Mode of Cell Proliferation. *Cell*, v. 152, n. 5, p. 997–1007, 2013.
- MICHEL-BRIAND, Y.; BAYSSE, C. The pyocins of *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochimie*, v. 84, n. 5-6, p. 499–510, 2002.
- MILLETTE, M. *et al.* Capacity of human nisin- and pediocin-producing lactic Acid bacteria to reduce intestinal colonization by vancomycin-resistant enterococci. *Applied and environmental microbiology*, v. 74, n. 7, p. 1997–2003, abr. 2008.
- MILOHANIC, E. *et al.* Transcriptome analysis of *Listeria monocytogenes* identifies three groups of genes differently regulated by PrfA. *Molecular microbiology*, v. 47, n. 6, p. 1613–25, mar. 2003.
- MING, X.; DAESCHEL, M. A. Correlation of Cellular Phospholipid Content with Nisin Resistance of *Listeria monocytogenes* Scott A. *Journal of Food Protection*, v. 58, n. 4, p. 416–420, 1995.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. *Dados Epidemiológicos - DTA período de 2000 a 2011* *. . Brasília, Brasil: [s.n.], 2011.

MIZRAHI, I.; BIRAN, D.; RON, E. Z. Involvement of the Pta-AckA pathway in protein folding and aggregation. *Research in microbiology*, v. 160, n. 1, p. 80–4, 2009.

MONTALBÁN-LÓPEZ, M. *et al.* Are bacteriocins underexploited? Novel applications for old antimicrobials. *Current pharmaceutical biotechnology*, v. 12, n. 8, p. 1205–20, ago. 2011.

MONTEIRO, K. M. *et al.* Proteomic analysis of the *Echinococcus granulosus* metacestode during infection of its intermediate host. *Proteomics*, v. 10, n. 10, p. 1985–99, maio 2010.

MOTTA, A. S.; LORENZINI, D. M.; BRANDELLI, A. Purification and partial characterization of an antimicrobial peptide produced by a novel *Bacillus* sp. isolated from the Amazon Basin. *Current microbiology*, v. 54, n. 4, p. 282–6, abr. 2007.

MUÑOZ, P. *et al.* Listeriosis: An emerging public health problem especially among the elderly. *The Journal of infection*, v. 64, n. 1, p. 19–33, jan. 2012.

NES, F. DE *et al.* Antimicrobial resistance and investigation of the molecular epidemiology of *Listeria monocytogenes* in dairy products. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 43, n. 4, p. 382–385, 2010.

NES, I. F.; BREDE, D. A.; DIEP, D. B. Class II Non-Lantibiotic Bacteriocins. In: KASTIN, A. (Org.). *Handbook of Biologically Active Peptides*. 2. ed. San Diego, California, EUA: Academic Press, 2013. p. 85–92.

NISHIE, M.; NAGAO, J.-I.; SONOMOTO, K. Antibacterial peptides “bacteriocins”: an overview of their diverse characteristics and applications. *Biocontrol science*, v. 17, n. 1, p. 1–16, mar. 2012.

ORNDORFF, P. E. *et al.* Host and bacterial factors in listeriosis pathogenesis. *Veterinary microbiology*, v. 114, n. 1-2, p. 1–15, 16 abr. 2006.

PAG, U.; SAHL, H.-G. Multiple activities in lantibiotics--models for the design of novel antibiotics? *Current pharmaceutical design*, v. 8, n. 9, p. 815–33, jan. 2002.

PAIVA, A. D.; BREUKINK, E.; MANTOVANI, H. C. Role of lipid II and membrane thickness in the mechanism of action of the lantibiotic bovicin HC5. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, v. 55, n. 11, p. 5284–93, nov. 2011.

PATTON, G. C.; VAN DER DONK, W. A. New developments in lantibiotic biosynthesis and mode of action. *Current opinion in microbiology*, v. 8, n. 5, p. 543–51, out. 2005.

PESEK, J. *et al.* Structure and mechanism of iron translocation by a Dps protein from *Microbacterium arborescens*. *The Journal of biological chemistry*, v. 286, n. 40, p. 34872–82, 7 out. 2011.

- PINTO, P. M. *et al.* Proteomic survey of the pathogenic *Mycoplasma hyopneumoniae* strain 7448 and identification of novel post-translationally modified and antigenic proteins. *Veterinary microbiology*, v. 121, n. 1-2, p. 83–93, 31 mar. 2007.
- PIPER, C. *et al.* Discovery of medically significant lantibiotics. *Current drug discovery technologies*, v. 6, n. 1, p. 1–18, mar. 2009.
- PY, B.; MOREAU, P. L.; BARRAS, F. Fe – S clusters , fragile sentinels of the cell. *Current opinion in microbiology*, v. 14, p. 218–223, 2011.
- RAMASWAMY, V. *et al.* Listeria — review of epidemiology and pathogenesis. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, v. 40, p. 4–13, 2007.
- REA, M. C. *et al.* Classification of Bacteriocins from Gram-Positive Bacteria. In: DRIDER, D.; REBUFFAT, S. (Org.). *Prokaryotic Antimicrobial Peptides from Genes to Applications*. New York, NY: Springer New York, 2011. p. 29–53.
- REIS, C. M. F. DOS *et al.* Antimicrobial susceptibilities of *Listeria monocytogenes* human strains isolated from 1970 to 2008 in Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 44, n. 2, p. 173–176, abr. 2011.
- RICHTER, K.; HASLBECK, M.; BUCHNER, J. The heat shock response: life on the verge of death. *Molecular cell*, v. 40, n. 2, p. 253–66, 22 out. 2010.
- RILEY, M. A. Molecular mechanisms of bacteriocin evolution. *Annual Review of Genetics*, v. 32, p. 255–278, 1998.
- RILEY, M. A.; WERTZ, J. E. Bacteriocin diversity: ecological and evolutionary perspectives. *Biochimie*, v. 84, n. 5-6, p. 357–64, 2002a.
- RILEY, M. A.; WERTZ, J. E. Bacteriocins: evolution, ecology, and application. *Annual review of microbiology*, v. 56, p. 117–37, jan. 2002b.
- RISSI, D. R. *et al.* Forma nervosa de listeriose em caprinos. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 26, n. 1, p. 14–20, 2006.
- ROCHE, B. *et al.* Iron/sulfur proteins biogenesis in prokaryotes: Formation, regulation and diversity. *Biochimica et biophysica acta*, v. 1827, n. 3, p. 455–69, mar. 2013.
- ROGERS, L. A.; WHITTIER, E. O. Limiting Factors in the Lactic Fermentation. *Journal of bacteriology*, v. 16, n. 4, p. 211–29, out. 1928.
- ROJO-BEZARES, B. *et al.* Coculture-inducible bacteriocin activity of *Lactobacillus plantarum* strain J23 isolated from grape must. *Food microbiology*, v. 24, n. 5, p. 482–91, ago. 2007.
- SANT’ANA, A. S. *et al.* Prevalence, populations and pheno- and genotypic characteristics of *Listeria monocytogenes* isolated from ready-to-eat vegetables marketed in São Paulo, Brazil. *International journal of food microbiology*, v. 155, n. 1-2, p. 1–9, 2 abr. 2012.

- SANT'ANNA, V. *et al.* Influence of pH and sodium chloride on kinetics of thermal inactivation of the bacteriocin-like substance P34. *Journal of applied microbiology*, v. 110, n. 1, p. 156–62, jan. 2011.
- SCHNUPF, P.; PORTNOY, D. A. Listeriolysin O: a phagosome-specific lysin. *Microbes and infection / Institut Pasteur*, v. 9, n. 10, p. 1176–87, ago. 2007.
- SCOTT, P. R. Clinical diagnosis of ovine listeriosis. *Small Ruminant Research*, v. 110, n. 2-3, p. 138–141, mar. 2013.
- SETTANNI, L.; CORSETTI, A. Application of bacteriocins in vegetable food biopreservation. *International journal of food microbiology*, v. 121, n. 2, p. 123–38, 31 jan. 2008.
- SEVERINA, E.; SEVERIN, A.; TOMASZ, A. Antibacterial efficacy of nisin against multidrug-resistant Gram- positive pathogens. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 41, p. 341–347, 1998.
- SHAND, R. F. and Purification of Halocins : Peptide Antibiotics from Haloarchaeal Extremophiles. *Methods in Microbiology*, v. 35, n. 05, p. 703–718, 2006.
- SHEPARD, E. M. *et al.* Biosynthesis of complex iron – sulfur enzymes. *Current Opinion in Chemical Biology*, v. 15, p. 319–327, 2011.
- SHIVERS, R. P.; DINEEN, S. S.; SONENSHEIN, A. L. Positive regulation of *Bacillus subtilis* ackA by CodY and CcpA: establishing a potential hierarchy in carbon flow. *Molecular microbiology*, v. 62, n. 3, p. 811–22, nov. 2006.
- SIEGERS, K.; ENTIAN, K. D. Genes involved in immunity to the lantibiotic nisin produced by *Lactococcus lactis* 6F3. *Applied and environmental microbiology*, v. 61, n. 3, p. 1082–1089, 1995.
- SMITH, L. *et al.* Elucidation of the antimicrobial mechanism of mutacin 1140. *Biochemistry*, v. 47, n. 10, p. 3308–14, 11 mar. 2008.
- SOBRINO-LÓPEZ, A.; MARTÍN-BELLOSO, O. Use of nisin and other bacteriocins for preservation of dairy products. *International Dairy Journal*, v. 18, n. 4, p. 329–343, abr. 2008.
- SUGIMOTO, S. *et al.* The proper ratio of GrpE to DnaK is important for protein quality control by the DnaK-DnaJ-GrpE chaperone system and for cell division. *Microbiology (Reading, England)*, v. 154, n. Pt 7, p. 1876–85, jul. 2008.
- SWAMINATHAN, B.; GERNER-SMIDT, P. The epidemiology of human listeriosis. *Microbes and infection / Institut Pasteur*, v. 9, n. 10, p. 1236–43, ago. 2007.
- TAKALA, T. M.; SARIS, P. E. J. C terminus of NisI provides specificity to nisin. *Microbiology (Reading, England)*, v. 152, n. Pt 12, p. 3543–9, dez. 2006.

- TONG, Z. *et al.* Nisin inhibits dental caries-associated microorganism in vitro. *Peptides*, v. 31, n. 11, p. 2003–8, nov. 2010.
- TRAVIER, L. *et al.* ActA Promotes *Listeria monocytogenes* Aggregation, Intestinal Colonization and Carriage. *PLoS pathogens*, v. 9, n. 1, p. e1003131, jan. 2013.
- TURNER, S. R.; LOVE, R. M.; LYONS, K. M. An in-vitro investigation of the antibacterial effect of nisin in root canals and canal wall radicular dentine. *International endodontic journal*, v. 37, n. 10, p. 664–71, out. 2004.
- VAN BELKUM, M. J.; MARTIN-VISSCHER, L. A; VEDERAS, J. C. Structure and genetics of circular bacteriocins. *Trends in microbiology*, v. 19, n. 8, p. 411–8, ago. 2011.
- VÁZQUEZ-BOLAND, J. A *et al.* Pathogenicity islands and virulence evolution in *Listeria*. *Microbes and infection / Institut Pasteur*, v. 3, n. 7, p. 571–84, jun. 2001.
- VERHEUL, A. *et al.* Modifications of membrane phospholipid composition in nisin-resistant *Listeria monocytogenes* Scott A. *Applied and environmental microbiology*, v. 63, n. 9, p. 3451–3457, 1997.
- WAITE, B. L.; SIRAGUSA, G. R.; HUTKINS, R. W. Bacteriocin inhibition of two glucose transport systems in *Listeria monocytogenes*. *Journal of applied microbiology*, v. 84, n. 5, p. 715–21, maio 1998.
- WHITEHEAD, H. R. A substance inhibiting bacterial growth, produced by certain strains of lactic streptococci. *The Biochemical journal*, v. 27, n. 6, p. 1793–800, jan. 1933.
- WIEDEMANN, I. *et al.* Specific binding of nisin to the peptidoglycan precursor lipid II combines pore formation and inhibition of cell wall biosynthesis for potent antibiotic activity. *The Journal of biological chemistry*, v. 276, n. 3, p. 1772–9, 19 jan. 2001.
- WILLEY, J. M.; VAN DER DONK, W. A. Lantibiotics: peptides of diverse structure and function. *Annual review of microbiology*, v. 61, p. 477–501, jan. 2007.
- WOLF, D. *et al.* Cell envelope stress response in cell wall-deficient L-forms of *Bacillus subtilis*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, v. 56, n. 11, p. 5907–15, nov. 2012.
- XIE, L.; VAN DER DONK, W. A. Post-translational modifications during lantibiotic biosynthesis. *Current opinion in chemical biology*, v. 8, n. 5, p. 498–507, out. 2004.
- YEAMAN, M. R.; YOUNT, N. Y. Mechanisms of Antimicrobial Peptide Action and Resistance. *Pharmacological Reviews*, v. 55, n. 1, p. 27–55, 2003.
- ZACHAROF, M. P.; LOVITT, R. W. Bacteriocins Produced by Lactic Acid Bacteria a Review Article. *APCBEE Procedia*, v. 2, n. null, p. 50–56, jan. 2012.

Curriculum Vitae

1. Dados pessoais

Nome Kendi Nishino Miyamoto
Filiação Norio Miyamoto e Kyoko Nishino Miyamoto
Nascimento 09/02/1987 - Santa Maria/RS - Brasil
Carteira de Identidade 4087085091 SJS - RS - 21/02/2005
CPF 014.594.070-59

Endereço residencial Rua Otávio Binato 44, ap 201
Centro - Santa Maria
97010-360, RS - Brasil
Telefone: 51 81241617

Endereço profissional Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciência e Tecnologia dos Alimentos
Av. Bento Gonçalves, 9500 Prédio 43212, Sala 218
Agronomia - Porto Alegre
91501-970, RS - Brasil
Telefone: 51 33086249

Endereço eletrônico
E-mail para contato : kendinm@gmail.com
e-mail alternativo : kendi@cbiot.ufrgs.br

2. Formação acadêmica/titulação

2011 **Mestrado em Biologia Celular e Molecular.**
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil
Título: Análise proteômica comparativa de *Listeria monocytogenes* exposta a concentrações subletais de nisina
Orientador: Adriano Brandelli
Co-orientador: Henrique Bunselmeyer Ferreira
Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

2007 - 2011 **Bacharel em Biomedicina.**
Centro Universitário Franciscano, UNIFRA, Santa Maria, Brasil
Título: Identificação de sorotipos de *Salmonella sp.* por diferentes metodologias
Orientador: Roberto Christ Vianna Santos

2005-2006 **Graduação interrompido(a) em Engenharia Civil.**
Universidade Federal de Santa Maria, UFSM, Santa Maria, Brasil
Ano de interrupção: 2006

2002-2003 **Ensino médio (2ª e 3ª séries)**
Colégio Riachuelo, Santa Maria, Brasil

2001 **Ensino médio (1ª série)**
Escola estadual Manoel Ribas, Santa Maria, Brasil

3. Atuação profissional

A. Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS

Vínculo institucional

2011 - 2013 Vínculo: Estudante de Mestrado , Enquadramento funcional: Bolsista - CAPES/REUNI , Carga horária: 40, Regime: Dedicção exclusiva

B. Centro Universitário Franciscano – UNIFRA

Vínculo institucional

2010 - 2010 Vínculo: Estagiário , Enquadramento funcional: Pesquisa , Carga horária: 20, Regime: Parcial

2010 - 2010 Vínculo: Monitoria , Enquadramento funcional: Monitor em Micologia Clínica, Regime: Parcial

2009 - 2010 Vínculo: Monitoria , Enquadramento funcional: Monitor em Microbiologia Clínica , Carga horária: 10, Regime: Parcial

2007 - 2007 Vínculo: Tutoria , Enquadramento funcional: Tutor de Química Básica , Carga horária: 10, Regime: Parcial

C. Hospital Casa de Saúde – HCS

Vínculo institucional

2010 - 2011 Vínculo: Estagiário , Enquadramento funcional: Estágio em Análises Clínicas , Carga horária: 30, Regime: Parcial

4. Revisor de periódico

A. Disciplinarum Scientia. Série Ciências da Saúde

Vínculo

2013 - Atual Regime: Parcial

5. Áreas de atuação

1. Bacterologia
2. Micologia
3. Genética Molecular e de Microorganismos
4. Proteômica

6. Idiomas

Inglês	Compreende Bem , Fala Bem , Escreve Bem , Lê Bem
Espanhol	Compreende Bem , Fala Razoavelmente , Escreve Pouco , Lê Bem
Japonês	Compreende Razoavelmente , Fala Razoavelmente , Escreve Pouco , Lê Pouco
Coreano	Compreende Pouco , Fala Pouco , Escreve Razoavelmente , Lê Razoavelmente
Português	Compreende Bem , Fala Bem , Escreve Bem , Lê Bem

7. Produção

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

1. DELIBERALI, B., **MIYAMOTO, K. N.**, WINCKLER NETO, C. H. D. P., PULCINELLI, R., AQUINO, A. R. C., SANTOS, R. C. V.
Prevalência de Bacilos Gram Negativos Não-Fermentadores de Pacientes Internados em Porto Alegre-RS. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial (Impresso)*. , v.47, p.529 - 534, 2011.

Trabalhos publicados em anais de eventos (completo)

1. OLIVEIRA, D. C., **MIYAMOTO, K. N.**, ZANETTE, R. A., DA SILVA, A., ROSSATO, L., DA ROCHA, M. P., HERRMANN, G. P., NEVES, V. L., ALVES, S. H.
Avaliação do perfil enzimático de *Sporothrix schenckii* In: II Simpósio Internacional de Microbiologia Clínica, 2010, Florianópolis - SC.
II Simpósio Internacional de Microbiologia Clínica. , 2010.

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

1. **MIYAMOTO, K. N.**, CAPELETO, D. M., STEFANON, E. B. C., VASCONCELLOS, N. J. S.
Avaliação da citotoxicidade do extrato aquoso *Coniza bonariensis* (L.) CRONQUIST (ASTERACEAE) por meio do teste do *Allium cepa* In: XVI Congresso Brasileiro de Toxicologia, 2009, Belo Horizonte.
Anais do XVI Congresso Brasileiro de Toxicologia. , 2009. v.1.

8. Eventos

Participação em eventos

1. **I Encontro Científico da Biomedicina**, 2010. (Seminário)
2. **III Congresso Internacional de Bioanálises VI Congresso Sul-brasileiro de Biomedicina e X Semana Gaúcha de Biomedicina**, 2010. (Congresso)
3. **I Seminário Internacional do curso de Biomedicina e Mestrado em Nanociências da UNIFRA**, 2010. (Seminário)

4. Conferencista no(a) **I Ciclo de Palestras da Biomedicina: Excelência em Pesquisa e Diagnóstico Laboratorial**, 2009. (Simpósio)

Aplicação do Programa 5S em Laboratórios.

5. **I Congresso Internacional de Bioanálises, IV Congresso Sul-Brasileiro de Biomedicina e VIII Semana Gaúcha de Biomedicina**, 2008. (Congresso)

Organização de eventos

1. SANTOS, R. C. V., MARTINS, F. P., MARQUES, J. B., MIYAMOTO, K. N.

I Seminário Internacional do curso de Biomedicina e Mestrado em Nanociências da UNIFRA, 2010.

(Outro, Organização de evento)

2. **MIYAMOTO, K. N.**, TICIANI, R., SCHUH, G. M., BORIN, D. B., RUCHEL, J. B., ZIMMERMANN, C. E. P., ALMEIDA, E. F., SANTOS, A. D. O., SILVEIRA, T. Z., SCHNEIDER, T., FUGUEIREDO, M., MULLER, B., TROJAHN, D. F., POSSANI, L. M. M., PEIXOTO, A. S., MARTINELLI, C., CARDOSO, D.

I Ciclo de Palestras da Biomedicina: Excelência em pesquisa e diagnóstico laboratorial, 2009.

(Outro, Organização de evento)

3. **MIYAMOTO, K. N.**, BORIN, D. B., RUCHEL, J. B., REZER, J. F. P., LEAL, D. B. R., SAGRILLO, M. R.

I Jornada Interdisciplinar em Saúde e Semana Acadêmica da Biomedicina, 2007. (Outro,

Organização de evento)