

ANÁLISE TRANSCRICIONAL DE GENES RELACIONADOS À FORMAÇÃO DE BIOFILME E VIRULÊNCIA EM CEPAS DE *Listeria monocytogenes* DOS SOROTIPOS 1/2a E 4b, CULTIVADAS EM DIFERENTES TEMPERATURAS



UFRGS **XXV SIC**
PROFESQ **Salão Iniciação Científica**
CA - Ciências Agrárias

DIÓRGENES CARBONI¹, LUIZA PIETA², JEVERSON FRAZZON²,
¹ Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Agronomia
² Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos (PPGCTA-UFRGS)

INTRODUÇÃO

Existem treze diferentes sorotipos descritos para a *Listeria monocytogenes*, sendo os sorotipos 1/2a, 1/2b e 4b os responsáveis pela maioria dos casos humanos de listeriose, doença severa que acomete principalmente gestantes, idosos, imunocomprometidos e recém-nascidos. De grande preocupação para a indústria alimentícia, *L. monocytogenes* pode ser encontrada em diversas superfícies de plantas processadoras de alimentos, sendo capaz de se aderir e formar persistentes biofilmes, através de mecanismos moleculares ainda pouco conhecidos. Uma vez formados, estes biofilmes são bastante difíceis de serem eliminados por completo, comprometendo assim a qualidade sanitária de produtos alimentícios e resultando em diversos problemas e prejuízos, tais como danos aos equipamentos das indústrias e perdas de energia.

MATERIAIS E MÉTODOS

No presente trabalho, foi realizada a análise transcricional de genes relacionados à formação de biofilme e virulência em duas cepas de *L. monocytogenes*, sorotipos 1/2a e 4b, cultivadas a 7°C e 37°C, pela técnica de PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR).

Os primers para os genes analisados neste estudo (*agrA*, *degU*, *luxS*, *prfA*, *hly*, *actA*, *flaA*, *sigB*, *ltrC*, *sufS* e *sufU*) foram desenhados utilizando sequência genômica de *L. monocytogenes*. Para os experimentos de RT-qPCR foi preparado um mix de reação, contendo: 0,1 µM de cada primer (senso e anti-senso - Invitrogen), 25 µM de dNTPs (Promega), 1X tampão de reação (Invitrogen), 3 mM de MgCl₂ (Invitrogen), 1X SYBR Green (Bio-Rad), 0,25 U de enzima *Platinum Taq* DNA Polimerase (Invitrogen) e água para completar o volume final de 10 µL. Uma curva de diluição com as amostras de cDNA (diluições de 1:25, 1:50, 1:75, 1:100) foi realizada, para verificar qual concentração apresentava maior eficiência nos experimentos de RT-qPCR, e 10 µl de cada cDNA diluído foi adicionado a 10 µl de mix de reação, totalizando um volume final de 20 µL. A amplificação do DNA complementar foi realizada em aparelho ABI-7500 (Applied Biosystems), com microplacas de poliestireno contendo 96 poços, e todos os experimentos foram realizados em triplicatas biológicas e quadruplicatas experimentais.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para ambas as cepas, os genes *sigB*, *prfA*, *luxS*, *sufS*, *sufU*, *ltrC* e *flaA* apresentaram transcrição significativamente aumentada ($p < 0,05$) a 7°C, em comparação aos resultados para a condição de cultivo a 37°C, enquanto que o gene *hly* não variou significativamente a sua transcrição entre as duas temperaturas. O gene *actA* foi mais transcrito a 7°C para a cepa do sorotipo 1/2a, enquanto que não variou significativamente a sua transcrição entre as duas condições de crescimento para a cepa do sorotipo 4b. No entanto, para a cepa 1/2a, o gene *degU* não demonstrou diferença estatisticamente significativa entre seus níveis de transcrição nas duas temperaturas estudadas, mas para a cepa 4b, apresentou transcrição significativamente aumentada a 7°C. Interessantemente, a presença do gene *agrA* não foi detectada na cepa 4b, e os seus níveis de transcrição foram menores a 7°C para a cepa 1/2a. Todos estes resultados estão representados na Figura 1.

LABORATÓRIO DE BIOQUÍMICA DE MICRORGANISMOS ICTA-UFRGS

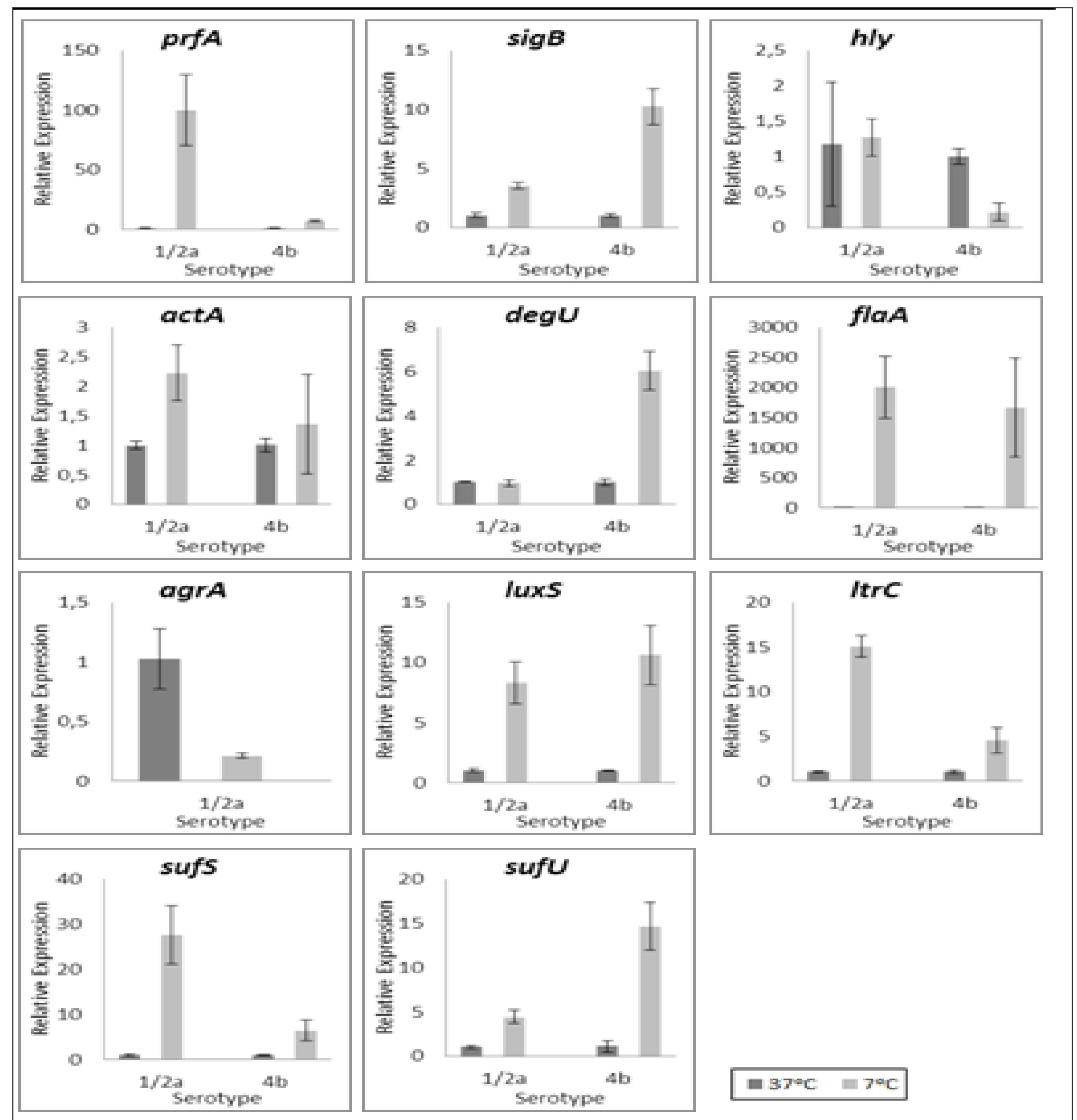


Figura 1: Expressão relativa dos genes *agrA*, *degU*, *luxS*, *prfA*, *hly*, *actA*, *flaA*, *sigB*, *ltrC*, *sufS* e *sufU*, normalizada com o gene *gap*, para as duas cepas de *Listeria monocytogenes* dos sorotipos 1/2a e 4b, a 7°C e 37°C, e seus respectivos valores de desvio padrão.

A maioria dos genes analisados neste trabalho foram mais transcritos a 7°C, em comparação aos seus níveis de transcrição obtidos a 37°C, resultados estes que demonstram a habilidade que o microrganismo tem de ativar diversos mecanismos quando submetido a condições de estresse (nesse caso, temperatura de refrigeração). Dessa forma, a bactéria consegue se manter viável e patogênica mesmo em situações adversas, o que reforça a importância de ser controlada a sua presença em estabelecimentos produtores de alimentos, principalmente naqueles que fazem uso de cadeia de frio.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

HAIN, T. et al. Comparative genomics and transcriptomics of lineages I, II, and III strains of *Listeria monocytogenes*. **BMC Genomics**, v. 13, doi: 10.1186/1471-2164-13-144 (publicação online em 24 de abril de 2012).

SUO, Y. et al. The expression of Superoxide Dismutase (SOD) and a Putative ABC Transporter Permease is inversely correlated during biofilm formation in *Listeria monocytogenes* 4b G. **PLoS One**, v. 7, n. 10, e48467, outubro 2012.

KAMP, H. D.; HIGGINS, D. E. A protein thermometer controls temperature-dependent transcription of flagellar motility genes in *Listeria monocytogenes*. **PLoS Pathogens**, v. 7, n. 8, e1002153, agosto 2011.

APOIO:



Laboratório de
Bioquímica de Microorganismos
ICTA - UFRGS



MODALIDADE
DE BOLSA

BIC UFRGS-REUNI