

QUANTIFICAÇÃO DOS NÍVEIS DE EXPRESSÃO DO *locus agr* EM ISOLADOS DE *Listeria monocytogenes* DURANTE A FORMAÇÃO DE BIOFILME SOB DIFERENTES CONDIÇÕES DE TEMPERATURA E TEMPO DE CONTATO

DARLA SILVEIRA VOLCAN⁽¹⁾; TATIANE KUKA VALENTE GANDRA⁽²⁾; ISABELA SCHNEID⁽³⁾; CAROLINE PEIXOTO BASTOS⁽⁴⁾; NACIELE MARINI⁽⁵⁾; WLADIMIR PADILHA DA SILVA⁽⁶⁾

¹Graduanda em Química de Alimentos – darlavalcan@yahoo.com.br

²Doutoranda em Ciência e Tecnologia de Alimentos – tkvgandra@yahoo.com.br

³Mestranda em Ciência e Tecnologia de Alimentos – isabelaschneid@gmail.com

⁴Professora Adjunta do Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos - carolpebastos@yahoo.com.br

⁵Pós-Doutoranda Centro de Genômica e Fitomelhoramento - nacy_marini@hotmail.com

⁶Professor Adjunto Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial – wladimir.padilha2011@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

Listeria monocytogenes é um micro-organismo psicrotrófico, frequentemente encontrado em alimentos, e causador de listeriose, uma doença invasiva com taxa de letalidade em torno de 20 a 30% que afeta geralmente grávidas, recém nascidos e adultos com sistema imunológico comprometido (LEMES-MARQUES et al., 2007).

Algumas cepas de *L. monocytogenes* podem contaminar os alimentos devido a sua capacidade de permanecer no ambiente de processamento de alimentos através da formação de biofilme (PAN et al., 2006). Miettinen et al. (1999) pesquisaram a ocorrência de *L. monocytogenes* em superfícies e em produtos prontos para o consumo de uma indústria de sorvetes e verificaram que isolados com o mesmo perfil genético estavam presentes em amostras coletadas por até sete anos.

Dentre os genes que influenciam na formação de biofilme, destacam-se os genes do *locus agr*, que é um *operon* composto por quatro genes: *agrB*, *agrC*, *agrD* e *agrA* (LYON & NOVICK, 2004). Em estudo conduzido por Rieu et al. (2007) foi verificado que os níveis de transcrição deste *locus* dependiam do estágio de desenvolvimento do biofilme. Nesse contexto o objetivo do trabalho foi quantificar os níveis de expressão dos genes do *locus agr* em isolados de *L. monocytogenes* submetidos a diferentes condições de temperatura e tempo de contato em superfícies de aço inox.

2. METODOLOGIA

Foram utilizados quatro isolados de *L. monocytogenes* pertencentes à bacterioteca do Laboratório de Microbiologia de Alimentos do DCTA/FAEM/UFPEL, selecionados por sua capacidade de formar biofilme e por sua origem (Tabela 1).

Tabela 1. Isolados de *L. monocytogenes* selecionados para avaliação da expressão do *locus agr* sob condições de formação de biofilme

Isolado	Fonte	Classificação quanto a produção de biofilme
LS006	Superfícies	Não formador
LS020		Formador

LA003
LA039

Alimentos

Não formador
Formador

A quantificação da expressão dos genes de cada isolado de *L. monocytogenes* foi avaliada em superfícies de aço inox seguindo o protocolo proposto por Rieu et al., (2007), sob diferentes condições de temperaturas (37°C, 20°C e 10°C) e tempos de contato (8h, 12h, 24h e 48h).

O mRNA foi extraído e purificado a partir de células de *L. monocytogenes* sob condições planctônicas (CP – cultivo em microtubo) e sob condições de formação de biofilme (CFB – superfície de aço inox com adição de 1% de glicose) utilizando-se o *RiboPure™ - Bacteria Kit (Ambion)*, de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante. A síntese de cDNA foi realizada com o *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems)*, de acordo com as instruções do fabricante.

A avaliação da expressão, utilizando os *primers* descritos na Tabela 2, foi realizada em termociclador *7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems)*, como descrito no protocolo da *Applied Biosystems*. O nível de expressão gênica, obtido através da quantificação relativa (QR), foi calculado baseado no *threshold cycle (Ct)*, onde o gene 16S rRNA foi utilizado como normalizador (endógeno) e, como controle de expressão, foi utilizada a expressão dos isolados em CP, nos mesmos tempos e temperaturas de contato da CFB.

Tabela 2. Sequências de oligonucleotídeos utilizadas para a quantificação da expressão do *locus agr* em *L. monocytogenes* sob CFB e sob CP

Gene	Primer For	Primer Rev	Tm teórica (°C)
<i>agrA</i>	GCAAGCAGAAGAACGGATTTCCAA	CGCTGTCTCAAAAAACAAGATAT	62,9/57,4
<i>agrB</i>	CGGCAGACACAGAAAGTTTG	TGCGAATGGTATTAGCAACG	60,4/58,4
<i>agrC</i>	GGGGTCAATCGCAGGTTTTG	CTTTAAGTTCGTTGGTTGCCGTA	62,4/61
<i>agrD</i>	AAATCAGTTGGTAAATTCCTTTCTAG	AATGGACTTTTTGGTTTCGTATACA	58,3/57,7
16S	GGTAGCCTGTTTCGCTAATGA	TAACCAATGGGATCCACAAG	58,1/57,9

Os resultados normalizados (LOG QR) foram submetidos à ANOVA, seguido do teste de média de Tukey, com o auxílio do software STATISTICA 7.0 (STATSOFT, 2004).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados da expressão dos genes do *locus agr* nos isolados de *L. monocytogenes* sob diferentes temperaturas e tempos de contato podem ser visualizados nas Figuras 1 e 2, respectivamente. A maior expressão ocorreu na temperatura de 37°C ($p < 0,05$) e, a menor expressão, a 10°C ($p < 0,05$). Os isolados não formadores de biofilme apresentaram menor expressão ($p < 0,05$) do *locus agr* que os isolados formadores de biofilme considerando as temperaturas de 10°C e 20°C. A 37°C não houve diferença na expressão entre os isolados ($p > 0,05$).

Estes resultados estão de acordo com os estudos de Autret et al. (2003), onde os genes do *locus agr* apresentaram maiores níveis de expressão a 37°C.

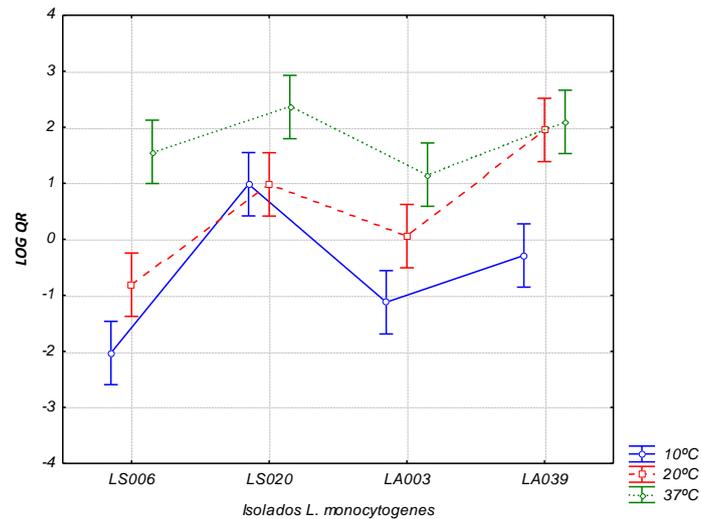


Figura 1. Relação entre a expressão do *locus agr* em isolados de *L. monocytogenes* sob diferentes temperaturas em condições de formação de biofilme (CFB)

Em relação aos tempos de contato, a menor expressão dos genes do *locus agr* ocorreu em 48 horas ($p < 0,05$) em relação aos outros tempos de contato analisados, especialmente para o isolado LS006 ($p < 0,05$). As maiores foram verificadas com 12 e 24 horas de contato ($p > 0,05$), havendo diferença entre os formadores e não formadores de biofilme para 24 horas de contato. Em estudo realizado por Rieu et al. (2008) foi verificado o envolvimento do sistema *agr* no início da formação do biofilme, mas não nas etapas posteriores de seu desenvolvimento, o que justifica a baixa expressão do *locus agr* no tempo de 48 horas.

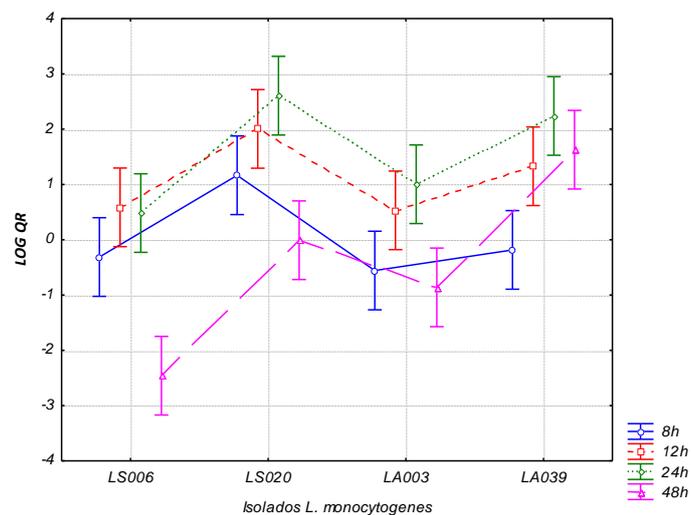


Figura 2. Relação entre a expressão do *locus agr* em isolados de *L. monocytogenes* sob diferentes tempos em condições de formação de biofilme (CFB)

4. CONCLUSÕES

Os isolados de *L. monocytogenes*, formadores e não formadores de biofilme apresentaram diferença nos níveis de expressão dos genes do *locus*

agr, as quais foram influenciadas pela temperatura e pelo tempo de contato com a superfície de formação de biofilme testada.

AGRADECIMENTOS

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) (Processo 11/1271-9) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (Processo 482524/2010-3) pelo apoio financeiro.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AUTRET, N.; RAYNAUD, C.; DUBAIL, I.; BERCHE, P.; CHARBIT, A. Identification of the *agr* locus of *Listeria monocytogenes*: role in bacterial virulence. **Infection and Immunity**, Washington D. C., v.71, n.8, p. 4463–4471, 2003

LEMES-MARQUES, E. G.; CRUZ, C. D.; DESTRO, M. T. Pheno- and genotypic characterization of *Listeria monocytogenes* clinical isolates from southwestern region of the State of São Paulo, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v.38, n. 2, p. 287-292, 2007.

LYON, G. J.; NOVICK, R. P. Peptide signaling in *Staphylococcus aureus* and other Gram-positive bacteria. **Peptides**, Los Angeles, v.25, n.9, p.1389-1403, 2004.

MIETTINEN, M. K.; BJÖRKROTH, K. J.; KORKEALA, H. J. Characterization of *Listeria monocytogenes* from an ice cream plant by serotyping and pulsed-field gel electrophoresis. **International Journal of Food Microbiology**, New York, v.46, n.3, p.187-192, 1999.

PAN, Y.; BREIDT Jr., F.; KATHARIOU, S. Resistance of *Listeria monocytogenes* biofilms to sanitizing agents in a simulated food processing environment. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington D. C., v.72, n.12, p.7711-7717, 2006.

RIEU, A.; WEIDMANN, S.; GARMYN, D.; PIVETEAU, P.; GUZZO, J. *agr* System of *Listeria monocytogenes* EGD-e: Role in Adherence and Differential Expression Pattern. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington D. C., v.73, n.19, p.6125-6133, 2007.

RIEU, A.; BRIANDET, R.; HABIMANA, O.; GARMYN, D.; GUZZO, J.; PIVETEAU, P. *Listeria monocytogenes* EGD-e Biofilms: No Mushrooms but a Network of Knitted Chains. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington D. C., v.74, n.14, p.4491-4497, 2008.

STATSOFT, **Statistica 7,0 for Windows, Computer Program Manual**. Tulsa: StatSoft, Inc., 2004.