



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
FACULDADE DE AGRONOMIA "ELISEU MACIEL"
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AGROINDUSTRIAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA AGROINDUSTRIAL

**EDITAL MEC/CAPES e MCT/FINEP
Programa Nacional de Pós-Doutorado - PNPD/2009**

Seleção pública de propostas de projetos de pesquisa e desenvolvimento voltados ao Programa Nacional de Pós-Doutorado - PNPD

Projeto *Inserção de Jovens Doutores nas Linhas de Pesquisa em C&T de Frutas e Hortaliças e de Microbiologia Agroindustrial do PPGCTA/UFPEL*

Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial (PPGCTA)
Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial (DCTA)
Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel (FAEM)
Universidade Federal de Pelotas (UFPEL)

Metodologias:

Sub-projeto I

Genes precoce e tardiamente expressos em frutos sob a ação de radiação UV-C

III- Material e Métodos

Estudo de genes precocemente e tardiamente expressos sob a ação de UV-C

Para esse experimento também serão utilizados tomates da cultivar Flavortop® no estágio de maturação "breaker". A partir de testes preliminares observou-se que é nesse estágio que se obtêm as maiores respostas fisiológicas ao UV-C. Imediatamente após a colheita será realizado o tratamento com UV-C com o auxílio de lâmpadas germicidas fluorescentes (Phillips® 30W), no comprimento de onda de 254nm. A intensidade da radiação emitida será mensurada com medidor de luz ultra-violeta digital (RS-232 Modelo MRUR-203, Instrutherm). Os frutos serão expostos à radiação a uma distância de 30 cm das extremidades distal, com dose hormic pré-estabelecida de 3,7Kj/m² (definida a partir de pesquisa preliminar exploratória), e baseada nos trabalhos de Charles et al. (2008 a e b). Após o tratamento, os frutos serão mantidos em temperatura de 20 a 23°C e 80 a 85 de UR. Como a radiação UV-C induz a síntese de etileno, um tratamento será destinado a avaliar o efeito da radiação UV-C



sem a ação do etileno. Para isso será feita a aplicação de 1-MCP. Desse modo, ter-se-ão os seguintes tratamentos: T1 - controle, sem aplicação de 1-MCP nem UV-C; T2 - tratamento com 2ppm de 1-MCP, sem tratamento com UV-C; T3 - tratamento com 2ppm de 1-MCP, seguido de tratamento com UV-C; T4 - tratamento com UV-C sem aplicação prévia de 1-MCP. A coleta de amostras para estudo da expressão gênica (Real-time PCR e microarranjos de RNA) será realizada por ocasião da colheita, imediatamente após a aplicação de 1-MCP (quando for o caso), e após o tratamento com UV-C, e 30 min (genes precocemente expressos), 1h (genes precocemente expressos), 3h (genes precocemente expressos), 6h (genes precocemente expressos), 12h (genes precocemente expressos), 24h (genes tardiamente expressos), 48h (genes tardiamente expressos), 72h (genes tardiamente expressos), e 96h (genes tardiamente expressos) após. No entanto, o estudo de microarranjos só será realizado, inicialmente, num único momento de coleta, provavelmente entre 30 min e 1 h após os tratamentos, a ser definido com estudo exploratório baseado em trabalhos já realizados com estudo de genes precocemente expressos frente a outros estímulos (Zegzouti et al., 1999; Narusaka et al., 2003; Park et al., 2006; Zhang et al., 2006; Cominelli et al., 2008). Desse estudo amplo, genes de destaque, sejam eles por serem estimulados ou reprimidos, terão o estudo de expressão detalhado por Real Time PCR. Adicionalmente, para os períodos mais prolongados após os tratamentos, além de monitorarem-se genes selecionados a partir dos resultados da técnica de microarranjos, também serão avaliadas expressões de genes participantes de vias metabólicas conhecidas como de resposta tardia. Para a avaliação bioquímico-fisiológica (coloração, carotenóides, compostos fenólicos, enzimas antioxidantes, ácido ascórbico, atividade antioxidante), as coletas serão realizadas antes e imediatamente após os tratamentos e 24, 48, 72 e 96h após.

Expressão transcricional por Real-Time PCR

O método para a extração de RNA total será baseado no protocolo do reagente Concert™ (*Plant RNA Reagent*), já adaptado pela equipe do projeto. Posteriormente, as amostras serão submetidas à separação, por eletroforese, em gel de agarose 1% (m/v), onde se verificará a presença e a integridade das bandas de RNAs ribossomais.

Com o objetivo de eliminar DNA genômico residual nas amostras de RNAs totais, será realizada digestão com DNase. Após a digestão, as amostras serão submetidas a síntese de cDNAs, com o uso do kit comercial *SuperScript™ First-Strand System for RT-PCR* (Invitrogen®). O produto dessa reação será utilizado nas reações de *Real Time - PCR*. Será utilizado o



sistema *SYBR[®] Green* (*Applied Biosystems[®]*) e aparelho ABI 7500 (*Applied Biosystems[®]*). Para cada tratamento será realizada a reação em triplicata utilizando placas com capacidade de 96 reações. Para cada amostra será calculado o valor do Ct (*Threshold cycle*) a partir da curva de amplificação. A média dos Ct's de cada amostra será utilizada para estudo de quantificação relativa utilizando o 18S como normalizador (padrão interno) e as amostras proveniente dos frutos no momento da colheita como o calibrador. Será então calculado o $\Delta\Delta CT$ que será utilizado na equação para expressar os dados os resultados (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). Após cada reação de PCR será realizada a construção da curva de dissociação durante 30 min com temperatura aumentando gradualmente de 60 °C a 95 °C, comprovando dessa maneira a qualidade dos *primers* e cDNA na reação. Esses procedimentos já estão otimizados junto à equipe do projeto.

$$\begin{aligned} \text{médiaCt}_{\text{amostra}} - \text{médiaCt}_{18S} &= \Delta\text{Ct}_{\text{amostra}} \\ \Delta\text{Ct}_{\text{amostra}} - \Delta\text{Ct}_{\text{calibrador}} &= \Delta\Delta\text{Ct} \\ 2^{-\Delta\Delta\text{Ct}} \end{aligned}$$

Caracterização bioquímico-fisiológica de tomates tratados cm UV-C

A coloração será avaliada com o emprego do colorímetro Minolta CR - 300, fonte de luz D65 e 8 mm de abertura, no padrão CIE-Lab, sendo expressa pelo ângulo Hue e calculada pela seguinte equação: $h^{\circ} = \tan^{-1} b^* \cdot a^{*-1}$.

O teor de Ácido Ascórbico (AA) será quantificado através de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), utilizando o aparelho HPLC-Shimadzu, equipado com injetor automático e detector UV-visível (254 nm). Os resultados serão obtidos a partir de curva padrão elaborada com concentrações variadas de ácido L-ascórbico e expressos de mg 100 g⁻¹, segundo método adaptado de Vinci et al. (1995). Pelos trabalhos prévios verificou-se que em tomates obtém-se índices de recuperação entre 90 e 96%.

A capacidade antioxidante será determinada utilizando o radical ABTS (2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolin 6-ácido sulfônico), de acordo com Erel et al. (2004). Os resultados serão expressos em $\mu\text{mol TE g}^{-1}$ (equivalente Trolox por grama de fruto).

O teor de compostos fenólicos totais será determinado pelo método de Folin-Ciocalteu (Singleton & Rossi, 1965), e os resultados expressos em mg.100g⁻¹. Os compostos fenólicos: ácido cafeico, ácido ferúlico, ácido p-cumárico, ácido gálico, ácido elágico, ácido p-hidroxibenzóico, quercetina, kaempferol, miricetina, (+) catequina e (-) epicatequina serão



quantificados por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), com base no método proposto por Zambiasi. (1997).

O teor de carotenóides totais será determinado pelo método proposto por Rodriguez-Amaya (1999) e Fraser et al. (2000), e os resultados expressos em mg.100g^{-1} . Os carotenóides: zeaxantina, β -criptoxantina, licopeno, β -caroteno, serão quantificados por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), com base no método adaptado de Rodriguez-Amaya (1999).

Atividade das enzimas antioxidantes

A extração das enzimas para determinação da atividade antioxidante, será realizada a partir de 1g de tecido, macerado e homogeneizado em 3,0mL de tampão fosfato de sódio, pH 7,8 contendo 0,01%(v/v) de Triton X-100, 1mM de EDTA e centrifugado a 10000xg a 4°C por 15 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante será recuperado e utilizado como extrato bruto para o ensaio das atividades enzimáticas. A concentração protéica será determinada pelo método de Bradford (1976).

Catalase - CAT (EC 1.11.1.6): será avaliada conforme descrito por Mazhoudi *et al.* (1997), com algumas modificações. O decréscimo na absorbância será mensurada a 240nm por 1minuto e os resultados expressos em $\text{nmol H}_2\text{O}_2.\text{min}^{-1}.\text{mg proteína}^{-1}$.

Peroxidase - POD (EC 1.11.1.7): será avaliada conforme descrito por Córdoba-Pedregosa *et al.* (2003) com algumas modificações, sendo que os resultados serão expressos em $\text{nmoles Guaiacol oxidado.min}^{-1}.\text{mg protein}^{-1}$.

Superóxido Dismutase - SOD (EC 1.15.1.1): será avaliada de acordo com o método descrito por Ehsani-Moghaddam *et al.* (2006). Os resultados serão expresso em $\Delta_{\text{OD}560\text{nm}}.\text{min}^{-1}.\text{mg protein}^{-1}$.

Ascorbato Peroxidase - APX (EC 1.11.1.1): será avaliada de acordo com Dewir *et al.* (2006), com modificações. O decréscimo na absorbância será mensurado a 290nm por 3 minutos (Asada, 1992), sendo os resultados expressos em $\text{nmol de ascorbato oxidado.min}^{-1}.\text{mg protein}^{-1}$.

Extração de RNA, síntese de cDNA e análise de microarranjos

Para o estudo amplo de genes precocemente expressos será utilizada a técnica de microarranjos. Para isso serão comparadas as amostras UVC (30 min ou 1h) e 1-MCP + UVC (30 min ou 1h) com a amostra controle (30 min ou 1h). Os RNAs serão extraídos com o



reagente comercial Concert™ (Invitrogen, USA). O experimento de microarranjos será conduzido utilizando o *microarray EU Tom1 12K oligo-arrays* (http://gbf.ensat.fr/chips_gbf.php), que contém 12.160 oligos (no tamanho de 70 nucleotídeos cada), incluindo 300 controles e 11.860 genes para tomate. Cada amostra (UVC (30 min ou 1h) e 1-MCP + UVC (30 min ou 1h)) será diretamente comparada com a amostra Controle (30 min ou 1h) seguindo o experimento *dye-swap* proposto por Churchill, (2002). O experimento será realizado em triplicata. A pré-hibridização, hibridização, lavagem e o tratamento dos dados gerados durante as análises de microarranjos serão executadas de acordo com o protocolo estabelecido pelo Laboratório de Genômica e Biotecnologia de Frutos - ENSAT - Toulouse. O custeio dessa avaliação é contrapartida da instituição francesa. Genes que apresentarem diferenças significativas de expressão pela técnica de microarranjos serão também avaliados por Real Time PCR.

Para o estudo dos genes tardiamente expressos será utilizada a técnica de PCR em tempo real, para isso serão construídos *primers* para genes das vias metabólicas do chiquimato, aminoácidos aromáticos, compostos fenólicos, carotenóides, clorofila, vitaminas hidrossolúveis, dentre outras.

IV - Principais contribuições científicas ou tecnológicas da proposta

Embora os tratamentos pré e pós-colheita com UV-C constituam-se em alternativa tecnológica para o aumento da vida de prateleira de frutos e hortaliças, e sua otimização constitui-se num avanço tecnológico significativo, nesse trabalho o objetivo maior está centrado na geração de conhecimento científico relacionado com a compreensão de como é percebido esse sinal e como se dá a regulação gênica decorrente do tratamento. Acredita-se que após a indução de genes precocemente expressos (genes primários de resposta ao UV-C), haja uma cascata de sinalização induzindo genes das vias metabólicas mais estudadas do ponto de vista molecular, bioquímico e fisiológico, como é o caso da síntese de compostos fenólicos, carotenóides, ácido ascórbico e folatos. Supõe-se, também, que pelo menos em parte, os genes tardiamente expressos exerçam funções fortemente relacionados com o metabolismo secundário, em grande parte originado ou que tenha a participação de plastídeos. Nesse contexto, será buscada a identificação de genes induzidos por UV-C e suas interações com a recepção do estímulo e aquisição de atributos de qualidade em frutos.



Sub-projeto II

DESENVOLVIMENTO DE IMS-PCR COM ANTICORPOS MONOCLONAIS CONTRA InIA PARA DETECÇÃO DE *L. monocytogenes* EM ALIMENTOS

2. MATERIAL E MÉTODOS

O projeto será desenvolvido utilizando estrutura existente em três laboratórios da UFPel: Laboratório de Microbiologia de Alimentos, do Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel; Laboratório de Imunologia Aplicada, do Centro de Biotecnologia; e Laboratório de Biologia Molecular, também do Centro de Biotecnologia.

2.1. Material

2.1.1. Cepas bacterianas

Serão utilizadas cepas de *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri*, *L. ivanovii*, *L. gray*, e de outras espécies bacterianas que possuam similaridade genética com a bactéria alvo.

2.1.2. Microesferas magnetizadas

Serão utilizadas microesferas de poliestireno magnetizadas com 0,86µm, recobertas com proteína A, em suspensão com 1% de sólidos (10mg.mL⁻¹) (Bangs Laboratories, Fishers, IN, USA)

2.1.3. Modelos biológicos

Serão utilizados camundongos da linhagem BALB/c com 6 a 8 semanas de idade, fornecidos pelo Biotério da UFPel.

2.1.4. Materiais para microbiologia e biotecnologia (Meios de cultura, *primers*, dNTPs, Taq DNA polimerase, etc.)

Serão adquiridos em empresas especializadas.

2.2. Métodos



2.2.1. Descrição dos experimentos

O trabalho constará de quatro experimentos em série, como segue:

A) Otimizar a IMS com MABs anti-InIA produzidos *in house*, que se realizará em três etapas em série:

- a.1) avaliar a especificidade dos MABs produzidos;
- a.2) sensibilizar as microesferas com o MAb de melhor desempenho no experimento anterior
- a.3) padronizar a IMS

B) Calibrar a PCR com sequência do gene *inIA* como molde

C) Comprovar o desempenho do IMS-PCR proposto em culturas puras de *L. monocytogenes*

D) Comprovar o desempenho do IMS-PCR proposto em alimentos artificialmente contaminados e naturalmente contaminados

2.2.2. Preparo do material para os experimentos

2.2.2.1. Amplificação do gene *inIA* e obtenção da rInIA

A sequência do gene *inIA* será obtida do GenBank e usada como molde para o desenho dos *primers*, visando a clonagem direcional de um fragmento do gene em plasmídeo, e para gerar, internamente aos sítios de restrição, um códon de iniciação ATG e um de terminação TAA nas extremidades 5' e 3' do gene, respectivamente. A sequência será amplificada por PCR a partir do DNA cromossomal de *L. monocytogenes*, o qual será extraído utilizando-se o kit PureGene (Gentra Systems). O produto de cada reação será analisado em gel de agarose, contendo brometo de etídeo. Após, será clonado no vetor pAE, entre os sítios de restrição *Bam*HI e *Kpn*I, e introduzido, por eletroporação, em cepas de *E. coli* TOP 10F. Os clones recombinantes serão selecionados e o DNA plasmidial extraído utilizando o kit GFX Microplasmid prep (GE Healthcare). Após, os plasmídeos recombinantes serão introduzidos na cepa de *E. coli* pLysS visando a expressão da proteína InIA recombinante (rInIA). Os clones recombinantes serão cultivados em caldo LB sob agitação (37°C - 250rpm⁻¹), até a fase log de



crescimento, e terão a expressão da proteína recombinante posteriormente induzida com 0,2 mM de IPTG.

2.2.2.2. Produção dos anticorpos monoclonais

A obtenção dos anticorpos monoclonais será feita de acordo com protocolo estabelecido por Harlow & Lane (1988). Camundongos da linhagem BALB/c com idade de seis a oito semanas, serão imunizados com a rInIA. No primeiro dia, será injetado intraperitonealmente (i.p) uma emulsão do imunógeno (100µg) em adjuvante de Freund completo. Nos dias 14 e 21 serão feitas doses de reforço com a mesma quantidade de antígeno em adjuvante de Freund incompleto. Ao fim da quarta semana, será retirado sangue através do plexo venoso retro-orbital para realização da titulação de anticorpos por um ELISA indireto com a proteína rInIA. Os dois camundongos com título mais alto de anticorpos receberão nova dose de antígeno endovenosa (e.v) e i.p e, após três a quatro dias, serão sacrificados para obtenção dos esplenócitos para realizar a fusão com as células de mieloma em presença de Polietileno glicol (PEG) 50%. As células serão cultivadas em DMEM-HAT com alta concentração de glicose e as cavidades com crescimento serão testadas num ELISA indireto. Os hibridomas secretores de MAb anti-rInIA serão clonados duas vezes pela técnica da diluição limitante, re-testados, expandidos e armazenados sob congelamento em nitrogênio líquido, ou injetados em camundongos para produção de ascite.

2.2.2.3. Purificação e classificação dos anticorpos monoclonais

Os anticorpos serão purificados a partir do fluido ascítico por precipitação com sulfato de amônia e cromatografia de afinidade com proteína A (IgG) ou gel filtração (IgM) (Harlow & Lane, 1988). A classe e subclasse dos anticorpos monoclonais será determinada com soros anti-classe e sub-classe específicos através de um teste ELISA disponível comercialmente (Sigma).

2.2.2.4. Especificidade dos anticorpos

A comprovação da reação específica dos MAb com *L. monocytogenes* será realizada através de ensaios ELISA indireto e Western blot (Harlow & Lane, 1988). Serão utilizados como antígenos, cultivos de *L. monocytogenes*, demais espécies de *Listeria*, e outras espécies bacterianas que possuam similaridade genética com a bactéria alvo. Cepas pertencentes a todos os sorotipos de *L. monocytogenes* serão incluídas no painel de antígenos.

2.2.2.5. Sensibilização das microesferas de poliestireno e padronização do protocolo de IMS

O MAb com melhor desempenho no experimento A.a.1. será utilizado para sensibilizar as microesferas de poliestireno magnetizadas. Para a sensibilização, serão determinadas as



concentrações de microesferas e de MAbs a serem utilizadas, de acordo com protocolo descrito por Conceição (2004). Após, será estabelecido protocolo para utilização da IMS na etapa de enriquecimento seletivo (em Caldo Fraser), o qual será artificialmente inoculado com cultivos puros de *L. monocytogenes* (cepa Scott-A). Para a separação das microesferas do caldo de enriquecimento, será utilizado um separador magnético de partículas (MPC-S, Dynal, Oslo, Norway) e, após a separação, estas serão lavadas três vezes com Salina Tamponada Fosfatada (PBS, pH 7,4) estéril, ressuspensas em PBS e semeadas em ágar seletivos para *Listeria* (Oxford e Palcam), para isolamento e caracterização das colônias. A avaliação da sensibilidade do protocolo será realizada tendo-se como controle o método convencional de cultivo.

2.2.2.6. Avaliação da especificidade do *primer* para detecção de *L. monocytogenes* por PCR

A sequência do gene *inlA*, obtida do GenBank, será usada como molde para o desenho dos *primers*. As condições da PCR, como temperaturas de anelamento e concentração ideal de *primers* e $MgCl_2$, serão otimizadas, e os produtos serão visualizados através de eletroforese em gel de agarose contendo brometo de etídio. A especificidade da PCR será determinada utilizando-se DNA extraído de *L. monocytogenes* como controle positivo, e das demais espécies de *Listeria*, e de outras espécies bacterianas que possuam similaridade genética com a bactéria alvo, como controle negativo.

2.2.2.7. Preparação do inóculo de *Listeria monocytogenes* para avaliação da sensibilidade do IMS-PCR

Uma cepa de *L. monocytogenes* Scott A será inoculada em TSB com extrato de levedura 0,6% (TSB-YB), e incubada a 37°C por 24h. A partir desse crescimento, serão preparados inóculos em TSB-YB, com concentrações finais de zero, 10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^4 e 10^5 UFC.g⁻¹, as quais serão confirmadas por contagem em placas, utilizando-se ágar para Contagem em Placas (PCA). Esses inóculos serão utilizados para avaliação da sensibilidade para detecção de *L. monocytogenes* pelo IMS-PCR proposto e pelo método convencional de cultivo

2.2.3. Avaliações

2.2.3.1. Especificidade dos MAbs por ELISA indireto e Western blot, conforme protocolo proposto por Harlow & Lane, 1988.

2.2.3.1.1. Quantidade de IgG (MAb) adsorvida às microesferas, por espectrofotometria, conforme protocolo proposto por Conceição, 2004.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
FACULDADE DE AGRONOMIA “ELISEU MACIEL”
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AGROINDUSTRIAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA AGROINDUSTRIAL

2.2.3.1.2. Método convencional de cultivo: Será realizado conforme protocolo de Farber et al., 1994)

2.2.3.1.3. Especificidade do *primer* por PCR calibrado no laboratório.

2.2.3.1.4. Sensibilidade para detecção de *Listeria monocytogenes* em meio de cultura, pelo IMS-PCR proposto, tendo-se o método convencional como controle.

2.2.3.1.5. Sensibilidade para detecção de *Listeria monocytogenes* em alimentos, pelo IMS-PCR proposto, tendo-se o método convencional como controle.

