



AVALIAÇÃO DA FORMAÇÃO DE BIOFILME E ADESÃO/INVASÃO A CÉLULAS CACO-2 TRIDIMENSIONAIS POR *Listeria monocytogenes* EM PRESENÇA DE BACTERIOCINA E PREBIÓTICO

H.R.A, SILVA¹, M.G, PEREIRA¹, M.H, ISHIZAWA¹, E.C.P, DE MARTINIS¹

Departamento de Análises Clínicas, Toxicologia e Bromatologia– Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – CEP: 14040-903 – Ribeirão Preto – SP – Brasil, Telefone: +55 (16) 3315-4267 – Fax: +55 (16) 3315-4725 – e-mail: (hevelinregiane@usp.br)

RESUMO –*Listeria monocytogenes* é uma bactéria transmitida principalmente via alimentos. Uma abordagem para o controle listeriano é o uso de bacteriocinas, combinadas com prebióticos. O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade anti-biofilme, e influência na adesão/invasão da bacteriocina de *Lactobacillus sakei* 1, com o prebiótico inulina, frente *Listeria monocytogenes*. Os ensaios foram realizados com bacteriocina de *Lactobacillus sakei* 1 e inulina. O ensaio de biofilme foi realizado em microplacas e os ensaios de adesão e invasão foram realizados utilizando células Caco-2 tridimensionais. Os resultados demonstraram que a formação de biofilme por *Listeria monocytogenes* foi inibida pela bacteriocina, e inulina, e a adesão/invasão foram significativamente menores na presença da bacteriocina, sendo que houve maior antagonismo na presença de inulina ($p < 0,05$) nestes experimentos. Esses dados demonstraram que a bacteriocina de *Lactobacillus sakei* 1 e inulina apresentam potencial no controle da formação de biofilmes e em fatores da patogenicidade (adesão/invasão) de *Listeria monocytogenes*.

ABSTRACT – *Listeria monocytogenes* is a bacterium transmitted mainly via food. One approach to listerian control is the use of bacteriocins, with prebiotics. The objective of this work was to evaluate the anti-biofilm activity, and influence on the adhesion /invasion of *Lactobacillus sakei* 1 bacteriocins, with prebiotic inulin, against *Listeria monocytogenes*. The test was performed with bacteriocin from *Lactobacillus sakei* 1 and inulin. The biofilm assay was performed on microplates and the adhesion and invasion assays were performed using there-dimensional Caco-2 cells. The results demonstrated that the formation of biofilm by *Listeria monocytogenes* was inhibited by bacteriocin, and inulin, and the adhesion/ invasion were significantly lower in the presence of bacteriocin, with greater antagonism in the presence of inulin ($p < 0,05$) in these experiments. These data demonstrated, that the bacteriocin of *Lactobacillus sakei* 1 and inulin have potential to control the formation of biofilms and factors of pathogenicity (adhesion/invasion) of *Listeria monocytogenes*.

PALAVRAS-CHAVE: virulência; probióticos; prebióticos; cultura de células tridimensional.

KEYWORDS: virulence; probiotics; prebiotics; tridimensional cell culture.



1. INTRODUÇÃO

A inocuidade de alimentos atualmente apresenta grandes desafios, e a contaminação por *L. monocytogenes* é a principal fonte de transmissão da listeriose humana. O controle de *L. monocytogenes* é difícil, pois a bactéria é capaz de formar biofilmes, conferindo proteção a condições ambientais adversas. Além disso, tem capacidade de sobreviver e até multiplicar-se em temperaturas de refrigeração por longos períodos, em uma ampla faixa de pH (Braga et al., 2017). Após a ingestão de um alimento contaminado por *L. monocytogenes*, esta consegue chegar até o epitélio intestinal, e atravessa a barreira epitelial, chegando até à lâmina própria, e por meio do sangue e da linfa, chegando a órgãos alvos (fígado e baço) e pode até atravessar a barreira hematoencefálica em hospedeiros imunocomprometidos, bem como a barreira feto placentária, em gestantes. O acesso às vilosidades intestinais por *L. monocytogenes* ocorre pela ligação à E-caderina, este receptor faz o processo de fosforilação, resultando na internalização da bactéria. Este processo de invasão às células hospedeiras é mediado por vários fatores de virulência (Radosevich; Cossart, 2018).

Os probióticos são micro-organismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem um benefício à saúde do indivíduo (Hill et al., 2014). Bactérias lácticas (BAL) representam o maior grupo de micro-organismos considerados probióticos e são reconhecidas pela ampla produção de substâncias antimicrobianas, como as bacteriocinas (Perez et al., 2014). *Lactobacillus sakei* é uma BAL que pode ser isolada de produtos cárneos e produtos alimentares fermentados (Schuster; Vogel; Ehrmann, 2019). Prebióticos são definidos como ingredientes alimentares que não sofrem o processo de digestão, e assim estimulam o crescimento seletivo de bactérias benéficas no cólon (Roberfroid, 2007). Os frutanos do tipo inulina são prebióticos presentes em plantas (Claus, 2017).

Um avanço em estudos para a verificação da adesão e invasão pode ser alcançado pela utilização de cultivo de células tridimensional (3D). Caco-2 é uma linhagem de células derivadas de adenocarcinoma de cólon humano, sendo muito utilizadas como modelo de epitélio do intestino delgado, por assemelhar-se ao sistema *in vivo* (Ravi et al., 2014). Geralmente essas células são cultivadas em monocamadas, mas o cultivo convencional (2D), apresenta algumas limitações em comparação com modelos em 3D. Em formato 2D, as células são forçadas a se adaptarem em uma estrutura rígida e plana, alterando assim a fisiologia do epitélio e não mimetizando com precisão as interações célula-célula *in vivo* e seu microambiente (Ravi et al., 2014).

Uma das técnicas para o cultivo de células em 3D é feita em um biorreator rotativo que simula um ambiente de microgravidade - the "Slow Turning Lateral Device" (STLV). Diante do exposto, o objetivo neste trabalho foi avançar no estudo da atividade antilisteriana do extrato bruto de bacteriocinas do candidato a probiótico *Lactobacillus sakei* 1 (de nossa coleção de culturas), e do prebiótico inulina como possíveis antagonistas da infecção por *L. monocytogenes* em células eucarióticas em cultivo tridimensional obtidas pelo biorreator (STLV) e avaliar também a ação anti-biofilme destes compostos frente a *L. monocytogenes*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Culturas bacterianas e preparação do prebiótico e do extrato bruto de bacteriocina semi -purificada

Foi utilizada *L. monocytogenes* ATCC 19115 e *Lactobacillus sakei* 1, disponíveis na coleção de culturas na FCFRP-USP. Para obtenção da bacteriocina semi-purificada (SLC) de *Lactobacillus sakei* 1, a cultura foi reativada, a cultura foi centrifugada e o sobrenadante foi esterilizado por filtração (0,22µm) e neutralizado (pH 7,0) com NaOH 4 M. Em seguida, foi feita a quantificação da atividade da bacteriocina pela técnica de microtitulação, expressando os resultados em Unidades Arbitrárias por ml (Mayr-Harting et al., 1972). O prebiótico inulina foi obtido de Orafiti Active Food Ingredients, Bélgica. Todos os experimentos foram realizados em triplicatas biológicas e os resultados analisados com os testes ANOVA e Dunnet, considerando significativo $P < 0,05$ (GraphPad Prism, GraphPad Software, La Jolla, CA).

2.2. Quantificação da formação de biofilme na presença de *L. sakei* 1 e inulina

O biofilme foi obtido de acordo com a metodologia de Yang et al. (2016) com modificações. Para isso, 10^6 UFC/mL de *L. monocytogenes* ATCC 19115 foram distribuídos em placas de 96 poços e incubadas a 37°C/24h para a formação da biomassa de biofilme bacteriano. Após este período a cultura foi lavada com solução salina, corada com cristal violeta 0,1% (p/v), secas e o corante das células aderidas foi solubilizado, para leitura espectrofotométrica (595nm). Foi testada a atividade de SLC de *L. sakei* 1 e inulina (1%), separados e em combinação.

2.3. Ensaio de adesão e invasão por *L. monocytogenes* em células Caco-2 em cultivo tridimensional (3D)

2.3.1. Cultura de células Caco-2 3D

O cultivo das células Caco-2 foi realizado seguindo o protocolo de Radtke e Herbst-Kralovetz (2012). As células foram transferidas para biorreator modelo “Slow Turning Lateral Device” e mantidas a 37°C, com 5% de CO₂ por 21 dias, quando os agregados celulares tridimensionais foram colhidos e transferidos para microtubos para realização de experimentos de adesão e invasão.

Ensaio de adesão de *L. monocytogenes* em células Caco-2 3D: Esses ensaios foram baseados em Moroni et al. (2006) e Merghni et al. (2015), com modificações. Para isso os agregados celulares tridimensionais (10^5 células/mL) contidos em 900µL de meio DMEM (sem antibiótico) foram preparados em quatro condições diferentes, sempre com MOI = 100:

- *L. monocytogenes* 10^7 UFC/mL;
- *L. monocytogenes* 10^7 UFC/mL e 100µL de SLC de *L. sakei* 1.
- *L. monocytogenes* 10^7 UFC/mL e 100µL de solução selecionada de inulina 1%.
- *L. monocytogenes* 10^7 UFC/mL e 100µL de SLC de *L. sakei* 1 e 100µL de inulina 1%.

Essas culturas foram incubadas 37°C/24h em 5% CO₂, e após incubação, foi feita a lavagem com solução PBS para remoção das bactérias não aderidas às células e posteriormente tratados com Triton X-100 (37°C; 15 minutos). Foram realizadas diluições decimais seriadas, e enumeração em placas de ágar Soja Trypticase adicionado de 0,6% de extrato de levedura - TSAye (Oxoid, Reino Unido), a fim de obter o número de bactérias “aderentes mais invasivas”. Para obter a contagem de “bactérias aderentes” é preciso subtrair a contagem de “bactérias invasivas” da contagem de bactérias “aderentes mais invasivas”. Em seguida, o número de “bactérias aderentes” é dividido pelo número de células bacterianas no inóculo inicial, multiplicado 100.

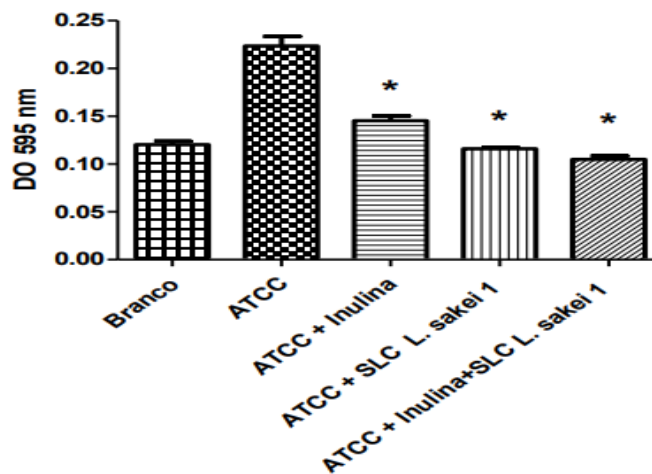
Ensaio de invasão de *L. monocytogenes* em células Caco-2 3D: Para determinação do número de bactérias invasivas, foi feito ensaio de acordo com Moroni et al. (2006) e Merghni et al. (2015), com modificações. Para isso os agregados celulares tridimensionais (10^5 células/mL) contidos em 900µL de meio DMEM (sem antibiótico) foram preparados em quatro condições diferentes como descrito anteriormente no ensaio de adesão, seguido de incubação a 37°C por 3 horas em atmosfera com 5% CO₂. As bactérias não aderidas foram removidas por lavagem com solução PBS e foram adicionados 250µL de solução de gentamicina (250µg/mL) a fim de matar as bactérias não internalizadas, com incubação por 1 hora a 37°C. Foi feita a lavagem com solução PBS para remoção das bactérias não aderidas às células Caco2 3D. Em seguida feito o tratamento com solução Triton X-100, posteriormente foram realizadas diluições decimais seriadas e enumeração em placas de TSAye. A porcentagem de invasão foi calculada utilizando a seguinte fórmula: % invasão= número de bactérias internalizadas x100/número total de bactérias adicionadas por poço.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A atividade do SLC de *L. sakei* 1 utilizado apresentou uma atividade 400 UA/mL, o que corrobora com dados de Martinez e De Martinis (2005). A concentração de inulina selecionada para os testes foi de 1 %, inulina, de acordo com Chen et al. (2017).

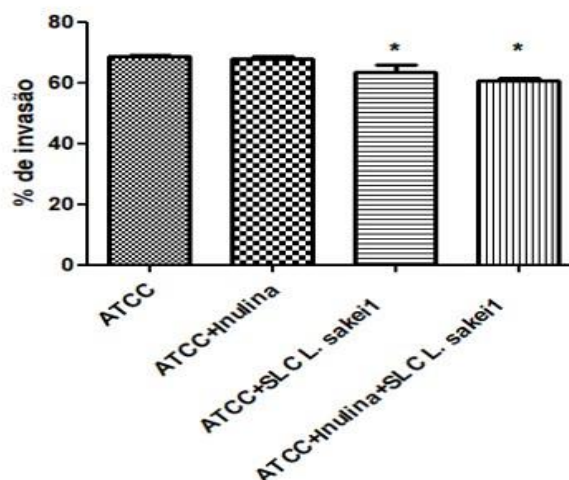
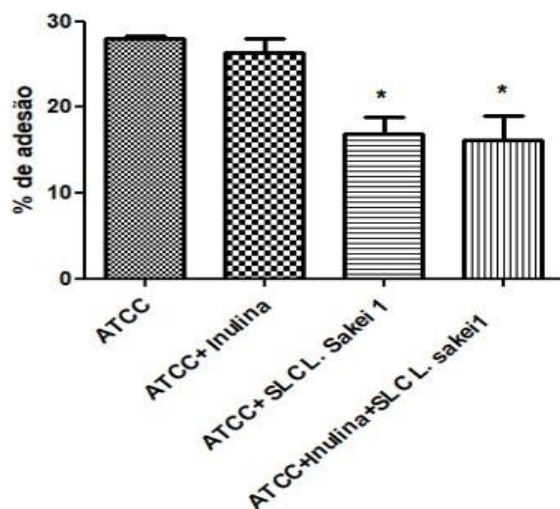
L. monocytogenes ATCC 19115 apresentou capacidade de formar biofilme de acordo com resultados anteriores (Winkelströter et al., 2011). Quando foi adicionado o prebiótico inulina, houve uma diminuição significativa ($P < 0,05$) na formação do biofilme por *L. monocytogenes* ATCC 19115, colaborando com resultados de Piotrowski et al. (2019). O tratamento com SLC de *L. sakei* 1 também reduziu a formação de biofilme ($P < 0,05$). Contudo, a combinação dos dois tratamentos (SLC de *L. sakei* 1 com inulina) apresentou maior eficiência ($P < 0,05$) como demonstrado na figura 1. Um possível mecanismo para a ação anti-biofilme de prebióticos e a interferência na comunicação bacteriana (*quorum sensing*) (Ackerman et al., 2018). As bacteriocinas de BAL podem ter atividade bactericida ou bacteriostática, além de poder impedir a fixação e favorecer o descolamento de células dos biofilmes (Rendueles; Ghigo, 2012). O SLC de *L. sakei* 1 combinado com inulina apresentou maior atividade antilisteriana, indicando que inulina pode potencializar a ação bacteriocina (Munoz et al., 2012).

Figura 1. Perfil de formação de biofilme de *L. monocytogenes* ATCC 19115, branco (somente meio de cultura); controle (ATCC); suplementado com inulina; suplementado com SLC de *L. sakei* 1; suplementado com inulina e SLC de *L. sakei* 1 por meio de quantificação espectrométrica (595nm). Todas as variáveis foram comparadas com cepa padrão *L. monocytogenes* ATCC 19115 em caldo BHI. * $p < 0,05$.



No ensaio de adesão e invasão *L. monocytogenes* com SLC de *L. sakei* 1, ocorreu uma diminuição na capacidade de adesão e invasão ($P < 0,05$) corroborando com outros estudos (Castellano et al., 2018; Gomes et al., 2012). Na presença do SLC de *L. sakei* 1 e de inulina, ocorreu a menor taxa de adesão e invasão ($P < 0,05$) conforme mostra a figura 2. O uso do prebiótico inulina não alterou de forma significativa a adesão e invasão de *L. monocytogenes* em células eucarióticas, em concordância com dados da literatura (Ebersbach et al., 2012; Chen et al., 2017; Quintero et al., 2011). A inibição da adesão e invasão pelas BAL pode ocorrer por meio de bloqueio competitivo da ligação a receptores celulares e também pode ser mediada por compostos antimicrobianos (Golowcycz et al., 2011; Gomes et al., 2012). É provável que o uso combinado do prebiótico com uma BAL probiótica potencialize a ação de bacteriocinas (Monteagudo-mera et al., 2019).

Figura 2-Perfil de adesão e invasão de *L. monocytogenes* ATCC 19115 em células Caco-2 em cultivo tridimensional em caldo BHI: controle (ATCC); suplementado com inulina; suplementado com SLC de *L. sakei* 1; suplementado com inulina e SLC de *L. sakei* 1. Todas as variáveis foram comparadas com cepa padrão *L. monocytogenes* ATCC 19115 em caldo BHI. * $p < 0,05$.



4. CONCLUSÕES

O extrato bruto de bacteriocinas (SLC) de *L. sakei* 1 e o prebiótico inulina podem ser de interesse para a obtenção de efeito simbiótico, pois apresentaram inibição da formação de biofilmes e da adesão e invasão de células intestinais frente a *L. monocytogenes*.

5. AGRADECIMENTOS

Apoio financeiro: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) cod. 001 bolsas de mestrado e pós-doutorado, respectivamente para HRAS e MGP. ECPDM é bolsista de Produtividade em Pesquisa 2 do CNPq.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ackerman, D.L, Craft, K.M, Doster, R.S, Weitkamp, J-H, Aronoff, D.M, Gaddy, J.A, Townsend, S.D.(2018).Antimicrobial and antibiofilm activity of human milk oligosaccharides against *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus aureus*, and *Acinetobacter baumannii* .*ACS infect Dis*, 4,315-324.
- Braga, V, Vázquez, S, Vico, V, Pastorino, V, Mota, M. I, Legnani, M, Schelotto, F, Lancibidad, G, Varela, G. (2017). Prevalence and serotype distribution of *Listeria monocytogenes* isolated from foods in Montevideo-Uruguay. *Brazilian Journal of microbiology*,48,689-694.
- Castellano, P, Ibarreche, M.P, Borges, L.L, Arias, F.C.N, Ross, G.R, De martinis, E.C.P. (2018) *Lactobacillus* spp. impair the ability of *Listeria monocytogenes* FBUNT to adhere to and invade Caco-2 cells. *Biotechnology Letters*,40,1237-1244.
- Chen, P, Reiter, T, Huang, B, Kong, N, Weimer, B. C. (2017). Prebiotic Oligosaccharides Potentiate Host Protective Responses against *L. monocytogenes* Infection. *Pathogens*,19,68-72.
- Claus, S.P.(2017). Inulin prebiotic: is it all about bifidobacteria? *Gut*,66,1883-1884.
- Ebersbach, T, Andersen, J.B, Bergström, A, Hutkins, R.W, Licht, T.R.(2012). Xylo-oligosaccharides inhibit pathogen adhesion to enterocytes in vitro. *Res Microbiol*,163,22–27.
- Golowczyc, M. A, Silva, J, Teixeira, P, De antoni, G. L, Abraham, A. G. (2011). Cellular injuries of spray-dried



- Lactobacillus* spp. isolated from kefir and their impact on probiotic properties. *Int. J. Food Microbiol*, 144,556–560.
- Gomes, B.C, Rodrigues, M.R, Winkelströter, L.K, Nomizo, A, De Martinis, E.C. (2012). *In vitro* evaluation of the probiotic potential of bacteriocin producer *Lactobacillus sakei* 1. *J Food Prot*,75,1083–1089.
- Hill, C, Guarner, F, Reid, G, Gibson, G.R, Merenstein, D.J, Pot, B, Morelli, L, Canani, R.B, Flint, H.J, Salminen, S, Calder, P.C, Sanders, M.E. (2014). The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*,11,506–514.
- Martinez, R.C.R, De Martinis, E.C.P. (2005). Avaliação de *Lactobacillus sakei* 1 produtor de bacteriocina frente *Listeria monocytogenes* 1/2a e sua atividade hemolítica. *Braz. J. Microbiol*,36.
- Mayr-Harting, A., Hedges, A. J, Berkeley, R.C.W. (1972). Methods for studying bacteriocins. In: *Methods in Microbiology*,7,313-342.
- Merghni,A,Nejma,M.B,Helali,I,Hentali,H,Bongiovanni,A,Lafont,F,Mahjoub,A,Mastouri,M.(2015).Assessment of adhesion, invasion and cytotoxicity potential of oral *Staphylococcus aureus* strains.*Microbial Pathogenesis*,86.
- Monteagudo-Mera, A, Rastall, R.A, Gibson, G.R, Charalampopoulos, D, Chatzifragkou, A. (2019) Adhesion mechanisms mediated by probiotics and prebiotics and their potential impact on human health. *Appl Microbiol Biotechnol*, 103,6463–6472.
- Moroni, O, Kheadr, J, Boutin, Y, Lacroix, C, Fliss, I. (2006). Inactivation of adhesion and invasion of food-borne *Listeria monocytogenes* by bacteriocin-producing Bifidobacterium stains of human origin. *Applied and Environmental Microbiology*,72,6894-6901.
- Munoz, M, Mosquera, A, Alméciga-Díaz, C.J, Melendez, A.P, Sánchez, O.F.(2012). Fructooligosaccharides metabolism and effect on bacteriocin production in *Lactobacillus* strains isolated from ensiled corn and molasses. *Anaerobe*,18,321–330.
- Perez, R.H, Zendo, T, Sonomoto, K. (2014). Novel bacteriocins from lactic acid bacteria (LAB): Various structures and applications. *Microb. Cell Fact*,13.
- Piotrowski, M, Wultańska, D, Obuch-woszczatyński, P, Pituch, H. (2019). Fructooligosaccharides and mannose affect *Clostridium difficile* adhesion and biofilm formation in a concentration-dependent manner. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*,38,1975–1984.
- Quintero, M, Maldonado, M, Perez-munoz, M, Jimenez, R, Fangman, T, Rupnow, J, Wittke, A, Russell, M, Hutkins, R. (2011). Adherence inhibition of *Cronobacter sakazakii* to intestinal epithelial cells by prebiotic oligosaccharides. *Curr Microbiol*,62,1448–1454.
- Radosevich L, Cossart P. (2018). *Listeria monocytogenes*: towards a complete picture of its physiology and pathogenesis. *Nat Rev Microbiol*,16,32–46.
- Radtke, A.L, Herbst-kralovetz, M.M. (2012). Culturing and Applications of Rotating Wall Vessel Bioreactor Derived 3D Epithelial Cell Models. *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, 62,3868-3891.
- Ravi, M, Paramesh, V, Kaviya, S.R, Anuradha, E, Paul solomon, F.D. (2014). 3D Cell Culture Systems: Advantages and Applications. *Journal of Cellular Physiology*, 16-26.
- Rendueles, O, Ghigo, J.M.(2012). Multi-species biofilms: how to avoid unfriendly neighbors. *FEMS Microbiol Rev*,36,972–989.
- Roberfroid, M. (2007). Prebiotics: the concept revisited. *J Nutr*,137,830-837.
- Schuster, J. A, Vogel, R. F, Ehrmann, M.A. (2019). Characterization and distribution of CRISPR-Cas systems in *Lactobacillus sakei*. *Arch Microbiol*,11.
- Winkeltröter, L.K, Gomes, B.C, Thomaz, M.R.S, Souza, V.M, De Martinis, E.C.P. (2011).*Lactobacillus sakei* 1 and its bacteriocin influence adhesion of *Listeria monocytogenes* on stainless steel surface. *Food Control*,22, p.1404-1407.
- Yang, X, Sha, K, Xu, G, Tian, H, Wang, X, Chen, S, Wang, Y, Li, J, Chen, J, Huang, N. (2016). Subinhibitory Concentrations of Allicin Decrease Uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) Biofilm Formation, Adhesion Ability, and Swimming Motility. *Int. J. Mol. Sci*,17,979-987.