

CAPACIDADE DE INVASÃO CELULAR *IN VITRO* DE *Listeria monocytogenes* ISOLADAS DE CARCAÇAS BOVINAS NO SUL DO BRASIL

MARIANA ALMEIDA IGLESIAS¹; CARLOS EDUARDO POUEY DA CUNHA²;
ISABELA SCHNEID KRONING³; LOUISE HAUBERT⁴; MARCELO MENDONÇA⁵;
WLADIMIR PADILHA DA SILVA⁶

¹Universidade Federal de Pelotas – maryanaiglesias@hotmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – cpouey@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – isabelaschneid@gmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas – louisehaubert@hotmail.com

⁵Universidade Federal de Pelotas – marcelomendoncavet@yahoo.com.br

⁶Universidade Federal de Pelotas – wladimir.padilha2011@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

Listeria monocytogenes é um patógeno intracelular facultativo, responsável por causar listeriose em indivíduos imunocomprometidos, sendo considerada de alto risco para gestantes, recém-nascidos e idosos. É classificado como um patógeno de origem alimentar desde 1980, quando surtos de listeriose foram comprovadamente associados ao consumo de alimentos contaminados (LUBER et al., 2011). Sua importância em saúde pública está relacionada à severidade desta infecção (ARRUDA et al., 2007), cuja taxa de letalidade pode atingir 30% (CDC, 2005). Ainda que a maioria dos casos de listeriose veiculada por alimentos não seja diagnosticada, essa é considerada a principal via de transmissão da doença ao homem (MANTILLA, 2006).

A patogênese de *L. monocytogenes* é resultante, principalmente, da sua capacidade de invadir, se multiplicar e sobreviver em fagócitos e células epiteliais (DUSSURGET; PIZARRO-CERDA; COSSART, 2004). *Listeria monocytogenes* possui uma grande variedade de proteínas de superfície e proteínas secretadas como importantes fatores na sua virulência (BIERNE, et al. 2007). Essas proteínas representam um ponto crítico que influencia na persistência deste patógeno no trato intestinal, aderência e entrada na célula do hospedeiro, na movimentação de célula para célula, e no escape do sistema imune do hospedeiro (SCHUPPLER; LOESSNER, 2010).

Tendo em vista que a capacidade de invadir a célula hospedeira é o ponto crucial para que *L. monocytogenes* inicie o ciclo infeccioso e cause a doença, o objetivo deste estudo foi avaliar a capacidade de invasão celular *in vitro* em células HCT-116 de isolados de *L. monocytogenes* provenientes de carcaças bovinas do sul do Brasil para determinar o potencial de virulência desses isolados.

2. METODOLOGIA

Doze isolados de *L. monocytogenes*, provenientes de carcaças, em dois pontos da linha de abate de bovinos (Ponto 1: sangria e Ponto 4: lavagem antes do pré-resfriamento) de frigoríficos-matadouros do sul do Brasil foram analisados. *L. monocytogenes* ATCC 7644, *L. innocua* CLIP 12612 e um isolado clínico local (*L. monocytogenes* LM08) foram usados como controles. A capacidade de invasão dos isolados de *L. monocytogenes* foi determinada pela técnica descrita por KIM et al. (2006), com pequenas modificações.

Células HCT-116 foram cultivadas em placas de 24 cavidades até atingir 90% de confluência com Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Sigma®) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Vitrocell®) e incubadas a 37 °C com 5% de CO₂ por 24 h. Os isolados foram cultivados em caldo TSB-YE por 18 h a 37 °C e, posteriormente, uma alíquota de 100 µL foi transferida para caldo Fraser e incubada por 18 h a 37 °C. Após este período, o cultivo foi centrifugado e lavado com tampão fosfato salino (PBS) e as células foram suspensas em 1 mL de DMEM. Após, 100 µL da suspensão bacteriana contendo, aproximadamente, 10⁶ células foram adicionadas às monocamadas de células com uma multiplicidade de infecção de 10:1 (Bactérias:HCT-116) e incubadas a 37 °C durante uma hora. As células bacterianas não aderentes foram removidas por lavagem com DMEM. As células HCT-116 foram tratadas com PBS contendo Triton X-100 0,1% durante cinco minutos à 37 °C, sob leve agitação. As células bacterianas aderidas e que invadiram as células foram quantificadas por semeadura em ágar Soja Triptona com 0,6% de extrato de levedura (TSA, Acumedia®-YE, Oxoid®).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os doze isolados de *L. monocytogenes* avaliados apresentaram capacidade de invasão celular *in vitro*, sendo que a porcentagem de invasão entre os isolados variou de 0,6% a 6,3%. Os controles positivos *L. monocytogenes* ATCC 7644 e LM08 apresentaram uma porcentagem de invasão de 6,3% e 5,2%, respectivamente. O controle negativo, *L. innocua* CLIP 12612, apresentou 0,59% de recuperação. Estes resultados podem ser visualizados na Tabela 1.

Tabela 1. Percentual de invasão dos doze isolados de *L. monocytogenes* provenientes de carcaças bovinas em células HCT-116

Isolado	Ponto de Isolamento	% de invasão
LM1	P4*	1,3%
LM2	P4	0,8%
LM3	P4	1,4%
LM4	P1*	4,2%
LM5	P1	5%
LM6	P1	2,5%
LM7	P1	4,8%
LM8	P1	3,5%
LM9	P1	4,2%
LM10	P4	1,13%
LM11	P4	0,6%
LM12	P1	2,2%
ATCC 7644		6,3%
CLIP 12612		0,59%
LM08		5,2%

*P1: Ponto 1: sangria; P4: Ponto 4: lavagem antes do pré-refriamento

Estes resultados estão de acordo com estudos anteriores, relatados por JARADAT; BHUNIA (2003), YAMADA et al. (2006) e BUENO et al. (2010). BUENO et al. (2010) também analisaram isolados de *L. monocytogenes* de

origem clínica e de alimentos provenientes do Brasil, e observaram que todos possuíam capacidade de invadir células de mamíferos. O mesmo foi encontrado por YAMADA et al. (2006) e JARADAT e BHUNIA (2003). Os autores relatam, ainda, a maior capacidade de invasão dos isolados clínicos em comparação aos de origem alimentar, o que também foi observado em nosso estudo, onde o isolado clínico LM08 e *L. monocytogenes* ATCC 7644 apresentaram capacidade de invasão celular superior em até 10 vezes quando comparados a alguns isolados de alimentos, embora alguns destes também tenham apresentado alta taxa de invasão. Estes dados sugerem que os isolados de alimentos possuem potencial para causar doença em humanos que estejam susceptíveis.

A diferença na capacidade de invasão celular entre os isolados de *L. monocytogenes* avaliados nesse estudo pode estar associada à variação na expressão de fatores de adesão e invasão específicos, principalmente em relação à internalina A (InLA). Essa variação pode estar relacionada com mutações no gene *inLA*, cujo produto permite a invasão de células epiteliais não fagocíticas, tais como as células epiteliais da mucosa intestinal em humanos (GAILLARD et al. 1987), sendo o principal fator necessário para invasão celular durante a ciclo inicial da listeriose (RAGON et al., 2008).

4. CONCLUSÕES

Os isolados de *L. monocytogenes* provenientes de carcaças bovinas do sul do Brasil possuem capacidade de invadir células de mamíferos, o que caracteriza um risco potencial, uma vez que essa característica está diretamente relacionada com a virulência dos isolados. Como os isolados de alimentos possuem capacidade de causar doenças em humanos susceptíveis, sugere-se que novas táticas de sanitização de frigoríficos sejam adotadas ou revisadas.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARRUDA G. A.; GERMANO, P. M. L.; MATTÉ, M. H.; OLIVEIRA, C. J. R. *Listeria* and listeriosis: **Hazard for pregnant**s. 2^a edição. São Paulo: Ponto Crítico, 2007.

BIERNE, H.; SABET, C.; PERSONNIC, N.; COSSART, P. Internalins: a complex family of leucine-rich repeat-containing proteins in *Listeria monocytogenes*. **Microbes and Infection**, France, v.9, n.10, p.1156-1166, 2007.

BUENO, V.F; BANERJEE, P; BANAD, P.P; MESQUITAA, A.J.; LEMES-MARQUESC, E.G; BHUNIA, A.K. Characterization of *Listeria monocytogenes* isolates of food and human origins from Brazil using molecular typing procedures and in vitro cell culture assays. **International Journal of Environmental Health Research**, v.20, n.1, p. 43-59, 2010.

CENTER FOR DISEASES CONTROL AND PREVENTION (CDC). Preliminary Foodnet data on the incidence of infection with pathogens transmitted commonly through-food – 10 States, United States, 2005.

DUSSURGET, O.; PIZARRO-CERDA, J.; COSSART, P. Molecular determinants of *Listeria monocytogenes* virulence. **Annual Review of Microbiology**, France, v.58, p.587-610, 2004.

GAILLARD J.L; BERCHE P; MOUNIER J; RICHARD S; SANSONETTI P.J. In vitro model of penetration and intracellular growth of *Listeria monocytogenes* in the human enterocyte-like cell line Caco-2. **Infection and Immunity**, France, v. 55, n.11, p. 2822–2829, 1987.

JARADAT Z, W; BHUNIA A.K. Adhesion, invasion and translocation characteristics of *Listeria monocytogenes* serotypes in Caco-2 cell and mouse models. **Applied Environmental Microbiology**, v. 69, n.6, p.3640–3645, 2003

KIM, K.P; JAGADEESAN, B; BURKHOLDER, K.M; JARADAT, Z.W; WAMPLER, J.L; LATHROP, A.A; MORGAN, M.T; BHUNIA, A.K. Adhesion characteristics of *Listeria* adhesion protein (LAP)- expressing *Escherichia coli* to Caco-2 cells and of recombinant LAP to eukaryotic receptor Hsp60 as examined in a surface plasmon resonance sensor. **FEMS Microbiological Letters**, United States of America, v.256, n.2, p.324-332, 2006.

LUBER, P; CRERAR, S; DUFOUR, C; FARBER, J; DATTA, A; TODD, E. C. D. Controlling *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods: Working towards global scientific consensus and harmonization — Recommendations for improved prevention and control. **Food Control**, v.22:9, p.1535–1549, 2011.

MANTILLA , S,P,S; FRANCO, R.M; OLIVEIRA, L.A.T; SANTOS, E.B., GOUVEA, R. Occurrence of *Listeria* spp. in bovine ground meat samples commercialized in Niterói, RJ, Brazil. **Ciência e Agrotecnologia**, v.31, p. 1225-230, 2007

RAGON, M; WIRTH,T; HOLLANDT, F; LAVENIR, R; LECUIT, M; LE MONNIER, A; BRISSE, S. A New Perspective on *Listeria monocytogenes* Evolution. **PLoS Pathogens**, United States of America, v.4, n.9, p. 1-14, 2008.

SCHUPPLER, M.; LOESSNER, M. J. The Opportunistic Pathogen *Listeria monocytogenes*: Pathogenicity and Interaction with the Mucosal Immune System. **International Journal of Inflammatory**, Switzerland, v.2010, p.704321, 2010.

YAMADA, F; UEDA, F; OCHIAI, Y; MOCHIZUKI, M; SHOJI, H; OGAWA-GOTO, K; SATA, T; OGASAWARA, K; FUJIMA, A; HONDO, R. Invasion assay of *Listeria monocytogenes* using Vero and Caco-2 cells. **Journal of Microbiological Methods**, v.66, n.1, p.96–103, 2006.