

REDUÇÃO DA ADESÃO DE *Salmonella* Typhimurium A CÉLULAS HCT-116 POR *Pichia pastoris* X-33: UMA AÇÃO PROBIÓTICA

RODRIGO CORREA FRANÇA¹; ARIZA, RODRIGO²; MOREIRA, GUSTAVO
MARÇAL SCHMIDT GARCIA³; MENDONÇA, MARCELO⁴; CONCEIÇÃO,
FABRÍCIO ROCHEDO⁵; MOREIRA, ÂNGELA NUNES⁶.

¹Universidade Federal de Pelotas - rodrigodfranca@yahoo.com.br;

²Universidade Federal de Pelotas - ariza.rodrigo@hotmail.com;

³Universidade Federal de Pelotas - moreira.gmsg@gmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas - marcelomendoncavet@yahoo.com.br;

⁵Universidade Federal de Pelotas - fabricao.rochedo@ufpel.edu.br

⁶Universidade Federal de Pelotas - angelanmoreira@yahoo.com.br

1. INTRODUÇÃO

Probióticos podem ser definidos como microrganismos, bactérias ou leveduras, que ao serem ingeridos em quantidades adequadas, trazem benefícios à saúde do hospedeiro (VANDENPLAS et al., 2008). Existem alguns critérios a serem considerados para qualificarmos um microrganismo como probiótico. A tolerância ao baixo pH, enzimas digestivas e sais biliares são pré-requisitos fundamentais para a sobrevivência do microrganismo à passagem através do trato gastrointestinal (TGI). Além disso, a capacidade de se aderir à superfície da mucosa intestinal é uma característica recomendada para assegurar a permanência do probiótico por longos períodos no TGI (OUWEHAND et al., 1999). Outro critério importante para que um microrganismo apresente potencial probiótico é o efeito protetor direto ou indireto contra enteropatógenos. Mecanismos de ação direta incluem a produção de substâncias antimicrobianas, que apresentam efeito inibitório ou letal para o patógeno (VANDENBERGH, 1993); inibição da adesão dos patógenos à mucosa intestinal, seja devido à co-agregação entre probiótico e patógeno ou por competição pelos sítios de adesão (CZERUCKA & RAMPAL, 2002); competição por nutrientes e inibição da produção ou ação de toxinas microbianas (BRANDÃO et al., 1998).

Bactérias do gênero *Salmonella* estão entre os principais agentes causadores de doenças de origem alimentar no mundo. Dentre os mais de 2500 sorovares identificados pertencentes a esse gênero, *Salmonella* Typhimurium é um dos mais envolvidos em casos de salmonelose humana (VUGIA et al., 2004).

Pichia pastoris é uma levedura da família Saccharomycetaceae, gênero *Pichia*, utilizada como sistema de expressão de proteínas recombinantes em larga escala. É capaz de alcançar altos níveis celulares de expressão e de realizar modificações pós-traducionais (CREGG, 2008). Estudos iniciais demonstraram que *P. pastoris* X-33 é inócua e capaz de resistir a passagem através do TGI de mamíferos e de inibir o crescimento de *S. Typhimurium* e *E. coli* em cultivos. Por esses motivos, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a capacidade da levedura *P. pastoris* X-33 inibir ou reduzir a adesão de *S. Typhimurium* a células intestinais HCT-116.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Microrganismos e condições de cultivo

Para utilização nos experimentos, colônias de *P. pastoris* cepa X-33 e *Saccharomyces boulardii* (controle positivo) isoladas em Ágar Yeast Peptone Dextrose (YPD) foram cultivadas em 3 mL de caldo Luria Bertani (LB) e incubadas overnight a 30°C em agitador orbital (150 rpm). Uma colônia isolada de *S. Typhimurium* foi cultivada em 3 mL de caldo LB, a 37°C, overnight, 200 rpm. Em seguida, 0,5 mL dos cultivos foram adicionados a tubos contendo 9,5 mL dos respectivos meios (YPD e LB). Os tubos contendo cultivos das leveduras e *S. Typhimurium* foram incubados sob agitação por 24 h a 30°C e a 37°C, respectivamente.

2.2 Efeito de *P. pastoris* X-33 sobre a adesão de *S. Typhimurium* a células HCT-116

Para avaliar a capacidade de *P. pastoris* X-33 inibir a adesão de *S. Typhimurium* a células intestinais HCT-116, os enterócitos foram cultivados em meio Roswell Park Memorial Institute (RPMI) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), em placas de 12 cavidades, na concentração de 1×10^6 células/cavidade. As placas foram incubadas a 37°C com 5% CO₂ até as células atingirem confluência total. A bactéria e as leveduras foram cultivadas conforme descrito anteriormente, lavadas duas vezes em PBS e ressuspensas em meio RPMI com 10% de SFB. *S. Typhimurium* (3×10^6 UFC por cavidade) foi adicionada a três cavidades isoladamente ou em combinação com 3×10^5 UFC por cavidade de *P. pastoris* X-33 ou de *S. boulardii* (controle positivo). Após 1 h de incubação com as células, o meio de cultura foi removido, as cavidades foram lavadas três vezes com PBS contendo 137 mM NaCl, 5,4 mM KCl, 3,5 mM Na₂HPO₄, 4,4 mM NaH₂PO₄ e 11 mM glicose (cell-PBS, pH 7,2) e incubadas com 100 µL de cell-PBS contendo Triton X-100 0,1% por 5 min a 37°C. Finalmente, os 100 µL foram removidos, diluídos em série decimal e a quantificação da adesão da bactéria foi realizada utilizando ágar XLD. Os resultados foram expressos em porcentagem de adesão às células.

As análises estatísticas foram realizadas através do pacote estatístico Statistix 9, utilizando o teste ANOVA. Foram considerados níveis de significância de 5%.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foi observada uma redução significativa, de aproximadamente 50% (de 7,6 para 4,0%), na porcentagem de adesão de *S. Typhimurium* às células intestinais HCT-116, quando incubada por 1 h com *P. pastoris* X-33, em comparação com a bactéria incubada isoladamente ($p < 0,05$) (Figura 1). Redução semelhante (42%) na porcentagem de adesão foi observada quando a bactéria foi incubada com *S. boulardii* (de 7,6 para 4,8%), utilizada como controle no presente trabalho, e por MARTINS et al. (2010), ao avaliar a capacidade de *S. boulardii* inibir a adesão e invasão de *S. Typhimurium* a células intestinais T84 (50%).

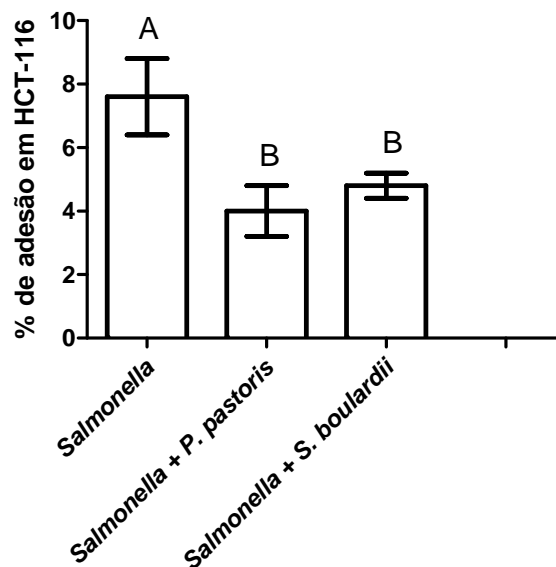


Figura 1. Percentual de adesão de *S. Typhimurium* a células intestinais HCT-116 após 1 h de incubação a 37°C isoladamente (3×10^6 UFC por cavidade) ou com *P. pastoris* X-33 ou *S. boulardii* (ambas a 3×10^5 UFC por cavidade). Letras diferentes representam diferença estatística ($p < 0,05$).

A inibição da adesão de *S. Typhimurium* às células HCT-116 é um indicio de que a ação probiótica de *P. pastoris* se assemelha a de *S. boulardii*, ou seja, que seu efeito esteja ligado ao bloqueio físico da adesão de patógenos ao epitélio intestinal. Apesar dos bons resultados, ainda são necessárias repetições desse experimento para que, posteriormente, possa ser feita uma análise com maior confiabilidade. Caso o resultado se confirme, ele comprova os dados já descritos para *S. boulardii* quanto à diminuição do efeito patogênico de *S. Typhimurium* em animais e que provam o efeito direto dessa levedura na adesão do patógeno na parede intestinal (MARTINS et al., 2010).

4. CONCLUSÃO

A levedura *P. pastoris* X-33 reduziu a adesão da bactéria patogênica *S. Typhimurium* às células intestinais HCT-116.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BRANDÃO, R.; CASTRO, I.M.; BAMBIRRA, E.A.; AMARAL, S.C.; FIETTO, L.G.; TROPIA, M.J.M.; NEVES, M.J.; SANTOS, R.G.; GOMES, N.C.M.; NICOLI, J., Intracellular signal triggered by cholera toxin in *Saccharomyces boulardii* and *Saccharomyces cerevisiae*, [Applied and Environmental Microbiology](#). V. 64 p. 564-568, 1998.

CZERUCKA, D.; RAMPAL, P., Experimental effects of *Saccharomyces boulardii* on diarrheal pathogens. **Microbes Infection**, v. 4, p. 733-739, 2002.

DRAGO L., Inhibition of in vitro growth of enteropathogens by new Lactobacillus isolates of human intestinal origin, [Federation of](#)

European Microbiological Societies **Microbiology Letters**, v. 153, p.455-463, 1997.

FRANÇA, R. C.; SEHN, C. P.; CORRÊA, M. S.; MENDONÇA, M.; SILVA, V. S.; CASTELLI, R. M.; HAUBERT, L.; CONCEIÇÃO, F. R.; MOREIRA, Â. N.; SILVA, W. P. Avaliação in vitro do potencial probiótico antimicrobiano de *P. pastoris*, "**25º CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA**" em 11 de Novembro de 2009, em Porto de Galinhas-PE.

FRANÇA, R. C.; SANTOS, D. G.; HAUBERT, L.; CONCEIÇÃO, F. R.; SILVA, W. P.; MOREIRA, A. N.; Reaproveitamento de Caldo Yeast Peptone Dextrose (YPD) para cultivo de *P. pastoris*, **XIX CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTIFICA, XII ENCONTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO**, Universidade Federal de Pelotas, 2010

CREGG J., The Pichia System, **Keck Graduate Institute**, Claremont, California. Disponível em http://rctech.com/pichia/pichia_system.pdf Capturado em 09/06/2008.

MARTINS F.S.; DALMASSO G.; ARANTES R.M.; DOYE A.; LEMICHEZ E.; LAGADEC P.; IMBERT V.; PEYRON J.F.; RAMPAL P.; NICOLI J.R.; CZERUCKA D.; Interaction of *Saccharomyces boulardii* with *Salmonella enterica* serovar Typhimurium protects mice and modifies T84 cell response to the infection. **PLoS One** 5, 2010.

MILETTE M., In vitro growth control of selected pathogens by *Lactobacillus acidophilus* casein-fermented milk, **Letters in Applied Microbiology**, v. 44, p.314-319, 2007.

OUWEHAND, A.C.; KIRJAVAINEN, P.V.; SHORTT, C.; SALMINEN S., Probiotics: mechanisms and established effects. **International Dairy Journal**, v. 9, p. 43–52, 1999.

PUUPPONEN-PIMIÄ, R.; AURA, A.M.; OKSMAN CALDENTY, K.M.; MYLLÄRINEN, P.; SAARELA, M.; MATTILA-SANHOLM, T.; POUTANEN, K. Development of functional ingredients for gut health. **Trends Food Science & Technology**, Amsterdam, v.13, p.3-11, 2002.

VUGIA, D.J.; SAMUEL, M.; FARLEY, M.M.; MARCUS, R., SHIFERAW, B.; SHALLOW, S.; SMITH, K.; ANGULO, F.J., **The Emerging Infections Program**, 2004.

VANDENBERG, P.A. Lactic acid bacteria, their metabolic products and interference with microbial growth. [Federation of European Microbiological Societies](#) **Microbiology Revision**, v12. p.221–238, 1993.

VANDENPLAS, YVAN & OSCAR BRUNSER & HANIA SZAJEWSKA, *Saccharomyces boulardii* in childhood, **Published online**: 19 December 2008.