



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL**

**POTENCIAL DA LECTINA CFL (*Cratylia argentea*) COMO ADJUVANTE  
TERAPÊUTICO EM CAMUNDONGOS INFECTADOS COM *Listeria  
monocytogenes***

**LUCAS NUNES SANTANA**

**RECIFE – PE  
2020**



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL**

**POTENCIAL DA LECTINA CFL (*Cratylia argentea*) COMO ADJUVANTE  
TERAPÊUTICO EM CAMUNDONGOS INFECTADOS COM *Listeria  
monocytogenes***

**LUCAS NUNES SANTANA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biociência Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como pré-requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Biociência Animal.

Orientador: Prof. Dr. José Vitor Moreira Lima Filho

**Recife – PE**

**2020**

**LUCAS NUNES SANTANA**

**POTENCIAL DA LECTINA CFL (*Cratylia argentea*) COMO ADJUVANTE  
TERAPÊUTICO EM CAMUNDONGOS INFECTADOS COM *Listeria  
monocytogenes***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biociência Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como pré-requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Biociência Animal.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. José Vitor Moreira Lima Filho (Orientador)  
Departamento de Biologia – UFRPE

---

Prof. Dr. Cláudio Augusto Gomes da Câmara  
Departamento de Química – UFRPE

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Jaqueline Bianque de Oliveira  
Departamento de Biologia – UFRPE

---

Dra. Jacqueline Ellen Camelo Batista  
(Examinadora Externa)

---

Prof. Dr. Joaquim Evêncio Neto  
Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal - UFRPE

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente ao meu orientador Prof. Dr. José Vitor M. L. Filho por todo apoio, paciência e dedicação durante esses dois anos de trabalho;

À equipe do Laboratório de Microbiologia e Imunologia (LAMIM): Lethicia, pela disponibilidade, ensinamentos e conselhos, sem os quais essa jornada seria muito mais difícil, e por ter me salvado tantas vezes; Renata, Ingrydt, Betty, Esther, Mayara, Gabriela e Juliana pela imensurável ajuda nos experimentos, pelas dicas, pelos conselhos trocados, pelo companheirismo, risadas, pausas para o almoço e café, e por tornarem nosso laboratório um ambiente agradável, unido e afetuoso;

À Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco (FACEPE) pelo apoio financeiro;

Às professoras e professores membros da banca pelos ensinamentos, sugestões, críticas construtivas e correções, me ajudando bastante a aprimorar este trabalho; e aos docentes, discentes e demais funcionários do Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal pelas contribuições para minha formação acadêmica;

Ao Dr. Márcio Viana Ramos, da Universidade Federal do Ceará (UFC), e à Dra. Nilma Cintra Leal do Instituto Aggeu Magalhães/FIOCRUZ, pela disponibilização do material biológico utilizado neste trabalho;

Ao professor Joaquim Evêncio e à equipe do Laboratório de Histologia, em especial Cedril, pelo auxílio na montagem das lâminas histológicas; e ao professor Francisco Leite e Bruno Paiva pela grande ajuda nas análises histopatológicas;

À equipe do Laboratório de Bacterioses da UFRPE por estar sempre disposta a ajudar, em especial Renata e o professor Rinaldo, sempre muito prestativos; e à do Laboratório de Genética, Bioquímica e Sequenciamento de DNA/UFRPE por todo o auxílio e suporte técnico;

Aos meus amigos, os que estão perto e os que estão longe, por me manterem firme e forte; à Ícaro, por estar sempre ao meu lado, pela ajuda, carinho, companhia, por me acalmar nos momentos mais difíceis e nunca ter deixado essa trajetória ser solitária;

Aos meus pais, por acreditarem e confiarem em mim. Por me seguirem e me apoiarem em todos os meus passos, garantindo que eu chegasse até aqui. A vocês eu dedico todas as minhas conquistas e todo o meu amor.

Obrigado!

## RESUMO

Doenças infecciosas causadas por micro-organismos antibiótico-resistentes estão entre as principais causas de mortalidade no mundo, gerando constantemente a necessidade de novos tratamentos. A lectina CFL (*Cratylia argentea*) é capaz de modular a resposta do sistema imunológico e se apresenta como potencial produto fitoterápico. Neste estudo, tal potencial foi avaliado em um modelo de infecção bacteriana causada por *Listeria monocytogenes*, causadora da listeriose, doença que representa alto risco para a saúde pública e para a economia. Para isso, foram utilizados 32 camundongos. Os animais do grupo experimental foram infectados via intraperitoneal com uma suspensão bacteriana a  $1 \times 10^7$  UFC/mL e, após 30 minutos, foram tratados com a lectina CFL via endovenosa nas dosagens de 0,1 ou 10 mg/kg. Como controle, foram utilizados animais não tratados e não infectados. Após 24 horas, foi realizada eutanásia dos animais. Em seguida, foi quantificado o número de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) no baço, fígado, pulmão, fluido peritoneal, sangue e macrófagos intraperitoneais dos animais; foram realizadas contagens total e diferencial de leucócitos circulantes no sangue e fluido peritoneal; foi analisado o dano nos tecidos dos órgãos por meio de histopatologia; o RNA do baço dos animais foi extraído para análise da expressão gênica das citocinas IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10 e TNF- $\alpha$  e da enzima iNOS; e foi avaliado o efeito antimicrobiano direto da lectina CFL contra *L. monocytogenes in vitro*. Como resultado, observou-se um aumento do peso médio do baço e pulmão dos animais infectados, mas isso foi prevenido pelo tratamento com a lectina CFL a 10 mg/kg, enquanto a lectina a 0,1 mg/kg foi capaz de prevenir o aumento do fígado. A lectina CFL a 10 mg/kg provocou redução da carga bacteriana no baço, fígado, sangue e macrófagos intraperitoneais dos animais infectados. Não se observou diferenças na contagem de leucócitos totais no sangue e fluido peritoneal entre os grupos animais. O número de neutrófilos, linfócitos, monócitos e eosinófilos não foi alterado no fluido peritoneal dos animais tratados com a lectina. Não foi encontrada diferença significativa na expressão gênica das citocinas, mas os animais infectados e tratados com a lectina CFL a 10 mg/kg tiveram aumento na expressão de iNOS. Os resultados sugerem que a lectina CFL possui potencial como adjuvante terapêutico contra infecções bacterianas intracelulares causadas por *L. monocytogenes*.

**Palavras-chave:** *Lectinas vegetais, Imunomodulação, Fitoterapia, Infecção bacteriana.*

## ABSTRACT

Infectious diseases caused by antibiotic-resistant microorganisms are among the main causes of mortality in the world, constantly generating the need for new treatments. CFL lectin (*Cratylia argentea*) is capable of modulating the immune system response and presents itself as a potential herbal product. In this study, this potential was evaluated in a model of bacterial infection caused by *Listeria monocytogenes*, which causes listeriosis, a disease that represents a high risk to public health and to the economy. For this, 32 mice were used. The animals in the experimental group were infected intraperitoneally with a bacterial suspension at  $1 \times 10^7$  CFU / mL and, after 30 minutes, treated with CFL intravenously at dosages of 0.1 or 10 mg / kg. As control, untreated and uninfected animals were used. After 24 hours, the animals were euthanized. Then, the number of Colony Forming Units (CFU) in the spleen, liver, lung, peritoneal fluid, blood and intraperitoneal macrophages of the animals was quantified; total and differential counts of leukocytes circulating in blood and peritoneal fluid were performed; damage to organ tissues was analyzed using histopathology; RNA from spleen was extracted to analyze the gene expression of the cytokines IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10 and TNF- $\alpha$  and the enzyme iNOS; and the direct antimicrobial effect of lectin CFL against *L. monocytogenes in vitro* was evaluated. As a result, an increase in the average weight of the spleen and lung of the infected animals was observed, but this was prevented by treatment with CFL (10 mg / kg), while CFL (0.1 mg / kg) was able to prevent the increase in liver. CFL at 10 mg / kg reduced the bacterial load in the spleen, liver, blood and intraperitoneal macrophages of infected animals. There were no differences in the total leukocyte count in blood and peritoneal fluid between animal groups. The number of neutrophils, lymphocytes, monocytes and eosinophils did not change in the peritoneal fluid of animals treated with the lectin. No significant difference was found in cytokine gene expression, but animals infected and treated with CFL at 10 mg / kg had an increase in iNOS expression. The results suggest that CFL lectin has potential as a therapeutic adjuvant against intracellular bacterial infections caused by *L. monocytogenes*.

**Key-words:** *Plant lectins, Immunomodulation, Phytotherapy, Bacterial infection.*

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	12
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	14
2.1 Lectinas.....	14
2.2 Resposta imune contra infecções bacterianas.....	18
2.3 <i>Listeria monocytogenes</i> .....	19
2.4 Listeriose.....	21
2.5 Processo infeccioso .....	22
3. OBJETIVOS .....	25
3.1 Objetivo Geral .....	25
3.2 Objetivos Específicos.....	25
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	26
4.1 Animais .....	26
4.2 Obtenção da lectina CFL.....	26
4.3 Micro-organismo.....	27
4.4 Infecção experimental .....	27
4.5 Tratamento com a lectina.....	27
4.6 Coleta de amostras .....	28
4.7 Quantificação bacteriana.....	28
4.8 Contagem total e diferencial de leucócitos.....	29
4.9 Histopatologia .....	29
4.10 Análise de expressão gênica de citocinas.....	29
4.11 Ação antimicrobiana direta.....	30
4.12 Estatística.....	31
5. RESULTADOS.....	32
6. DISCUSSÃO .....	43
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	48
8. REFERÊNCIAS.....	49



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Peso médio dos órgãos dos camundongos tratados com a lectina CFL e infectados com <i>Listeria monocytogenes</i> .....	33
<b>Figura 2.</b> Quantificação de bactérias em órgãos de camundongos tratados com CFL e infectados com <i>Listeria monocytogenes</i> .....	34
<b>Figura 3.</b> Quantificação de bactérias no fluído peritoneal e sangue de camundongos tratados com CFL e infectados com <i>Listeria monocytogenes</i> .....	36
<b>Figura 4.</b> Quantificação bacteriana intracelular em macrófagos peritoneais obtidos de animais tratados com CFL e infectados com <i>Listeria monocytogenes</i> .....	37
<b>Figura 5.</b> Histopatologia dos animais tratados com CFL e infectados com <i>Listeria monocytogenes</i> .....	38
<b>Figura 6.</b> Contagem total de leucócitos no sangue dos animais tratados com CFL e infectados com <i>Listeria monocytogenes</i> .....	39
<b>Figura 7.</b> Expressão gênica das citocinas inflamatórias em animais tratados com CFL e infectados com <i>Listeria monocytogenes</i> .....	40
<b>Figura 8.</b> Expressão gênica da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) no baço de animais tratados com CFL e infectados com <i>Listeria monocytogenes</i> .....	42

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Contagem total e diferencial de leucócitos no fluido peritoneal dos animais tratados com CFL e infectados com <i>Listeria monocytogenes</i> .....	39
--	----

## LISTA DE ABREVIATURAS

cDNA - Ácido desoxirribonucleico complementar

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais

CO<sub>2</sub> - Dióxido de carbono

CONCEA - Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal

Ct - *Cycle threshold*

FIOCRUZ - Fundação Oswaldo Cruz

fMLP - N-formilmetionil-leucil-fenilalanina

GAPDH - Gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase

HE – Hematoxilina e Eosina

IFN-I - Interferon-I

IL-10 - Interleucina-10

IL-12 - Interleucina-12

IL-13 - Interleucina-13

IL-1 $\beta$  - Interleucina-1 beta

IL-2 - Interleucina-2

IL-4 - Interleucina-4

IL-5 - Interleucina-5

IL-6 - Interleucina-6

InA - Internalina A

InB - Internalina B

INF- $\gamma$  - Interferon-gama

iNOS - Óxido nítrico sintase induzível

LIKA - Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami

LLO - Listeriolisina O

LPS - Lipopolissacarídeo

NaCl - Cloreto de sódio

NK - Natural Killer

NO - Óxido Nítrico

PAMPs - Padrões moleculares associados ao patógeno

PBS - Tampão fosfato-salino

PCR - Reação em cadeia da polimerase

pH - Potencial hidrogeniônico

RNA - Ácido ribonucleico

RPM - Rotação por minuto

RT-qPCR - Reação em cadeia da polimerase quantitativo em tempo real

SDS-PAGE - Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) com dodecil sulfato de sódio

Th1 - T helper 1

Th2 - T helper 2

TLR4 - Receptor Toll-like 4

TNF- $\alpha$  - Fator de Necrose Tumoral alfa

UFC - Unidades Formadoras de Colônia

UFC - Universidade Federal do Ceará

UFRPE - Universidade Federal Rural de Pernambuco

## 1. INTRODUÇÃO

Doenças infecciosas causadas por micro-organismos estão entre as principais causas de mortalidade no mundo todo (ROGALSKI et al., 2017). Além disso, o surgimento de micro-organismos antibiótico-resistentes e mais adaptados às defesas imunológicas do hospedeiro geram constantemente a necessidade de alternativas de tratamentos contra esses patógenos. A descoberta de novos adjuvantes terapêuticos, produtos farmacológicos que atuam na modulação do sistema imunológico, estimulando respostas imunes contra os micro-organismos, em vez de atuar diretamente contra os patógenos (FURA et al., 2016), tem se tornado cada vez mais urgente.

Considerando os avanços da fitoterapia, estimulada pelo baixo custo desses produtos e seu tradicional uso na cultura popular, o potencial de proteínas selecionadas como adjuvantes terapêuticos tem sido investigado. As lectinas, proteínas de origem não imunológica capazes de reconhecer e se ligar de maneira específica e reversível a carboidratos, são compostos bioativos encontrados nos vegetais, bastante estudados em pesquisas farmacológicas devido à sua atividade imunomodulatória (JANDÚ et al., 2017; SANTANA et al., 2014; SILVA et al., 2016).

A lectina CFL, encontrada na espécie vegetal *Cratylia argentea*, possui potencial biotecnológico como produto fitoterápico. Já foi demonstrado que essa lectina tem efeito citotóxico e genotóxico contra células tumorais (FAHEINA-MARTINS et al., 2011); foi utilizada no controle biológico de moluscos transmissores de doenças (SANTOS et al., 2010); possui ação anti-inflamatória (ASSREUY et al., 1997), além de ser capaz de estimular a secreção de histamina (GOMES et al., 1994) e possuir efeito calurético (HAVT et al., 2015). O potencial anti-infeccioso dessa lectina também foi anteriormente demonstrado contra infecções experimentais por *Salmonella enterica* (BATISTA et al., 2017; SILVA et al., 2016).

*Listeria monocytogenes* é uma bactéria gram-positiva causadora da listeriose, infecção bacteriana que acomete diversas espécies de animais, incluindo seres humanos. A bactéria é amplamente distribuída na natureza, podendo ser encontrada no solo, vegetação, água e em animais, tais como bovinos, caprinos, ovinos, suínos, equinos, aves, peixes e bivalves, além de equipamentos da pecuária, agricultura e em

alimentos (MCINTYRE; WILCOTT; NAUS, 2015). Devido à sua capacidade de sobreviver ao processamento de alimentos na indústria alimentícia, como alta concentração de sal, baixo pH e baixa temperatura, essa bactéria representa uma grande ameaça à indústria, sendo uma de suas principais preocupações (VÁZQUEZ-BOLAND et al., 2001). A listeriose é uma doença com alta taxa de mortalidade, com uma média de 20 a 30%, chegando a 75% em pacientes do grupo de risco, que inclui idosos, recém-nascidos, grávidas e imunodeprimidos (ROTHROCK et al., 2017). Nos Estados Unidos, *L. monocytogenes* está relacionada a 19% das mortes em humanos causadas por ingestão de alimentos contaminados (SCALLAN et al., 2011). No caso de surtos da doença em bovinos, caprinos e ovinos, a mortalidade pode chegar a 100% (BUNDRANT et al., 2011).

O tratamento da doença é feito com antibióticos (GÓMEZ et al., 2014; SEVEAU, 2014), entretanto diversas cepas resistentes a esses medicamentos já foram documentadas (ŞANLIBABA; TEZEL; ÇAKMAK, 2018a; SOUZA; TEBALDI; PICCOLI, 2015). A bactéria causadora da listeriose também possui diversos mecanismos adaptativos que a fazem resistente contra respostas imunológicas do hospedeiro (MARQUIS et al., 2016), reforçando a necessidade de tratamentos alternativos, bem como adjuvantes terapêuticos, que ajudem a combater esse micro-organismo que representa um risco para a saúde pública e para a economia.

Considerando o potencial imunomodulatório da lectina CFL e a carência de conhecimentos acerca de seus efeitos e mecanismos de ação em outros modelos de infecções, este estudo foi proposto para avaliar o potencial da lectina de ativar mediadores inflamatórios durante infecções experimentais *in vivo* causadas por *L. monocytogenes* em camundongos.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Lectinas

Lectinas são proteínas de origem não imunológica capazes de reconhecer e se ligar de maneira específica e reversível a carboidratos, e são conhecidas por sua capacidade de ativar diversos processos biológicos. Extremamente diversas e amplamente distribuídas na natureza, estão presentes em vertebrados, invertebrados, bactérias e plantas. As lectinas foram descobertas por Mitchel (1861) em um experimento onde se demonstrou a capacidade do veneno de cascavel (*Crotalus durissus*) de coagular sangue de pombos (MITCHELL, 1861). Em 1888, Stillmark descobriu a capacidade de extratos das sementes de *Ricinus communis* de aglutinar hemácias (STILLMARK, 1888). Desde então, diversos estudos foram feitos para se demonstrar as propriedades das lectinas, que possuem variações em relação às suas especificidades e estruturas, bem como suas atividades biológicas e potencial de aplicação biotecnológica.

Essas atividades biológicas das lectinas são decorrentes de sua capacidade de interagir com carboidratos da superfície de células do sistema imunológico, provocando transdução de sinal e produção de citocinas, proteínas responsáveis por emitir sinais entre células durante respostas imunes, gerando assim uma resposta contra potenciais tumores e agentes microbianos (LAM; NG, 2011; SOUZA et al., 2013). Os macrófagos e as células T auxiliares são as principais produtoras de citocinas, sendo assim, essas proteínas são capazes de gerar uma resposta imunológica tanto inata quanto adquirida (ZHANG; AN, 2009). Desse modo, as lectinas podem induzir uma resposta imune mesmo em pequena concentração, podendo estimular a produção de citocinas pró- e anti-inflamatórias (UNITT; HORNIGOLD, 2011).

A capacidade das lectinas de combater micro-organismos já foi demonstrada anteriormente. A atividade da lectina do látex de *Synadenium carinatum* contra *Leishmania amazonensis* foi demonstrada (AFONSO-CARDOSO et al., 2011). Em outro estudo, foi observada a capacidade da lectina de *Canavalia ensiformis* (Con A) de inibir a invasão do parasita *Enteromyxum scophthalmi* no intestino de peixes (REDONDO; ALVAREZ-PELLITERO, 2010). Já a lectina da planta Aroeira

(*Myracrodruon urundeuva*) foi capaz de combater bactérias gram-positivas, gram-negativas e fungos fitopatogênicos (SÁ et al., 2009). Enquanto que a lectina de *Cratylia mollis* (Cramoll) possui atividade anti-helmíntica contra *Schistosoma mansoni* (MELO et al., 2011). Também foi observado que lectinas de algas marinhas possuem efeitos antimicrobianos contra *Vibrio vulnificus* (LIAO et al., 2003). Em estudo *in vitro*, foi observada a capacidade da lectina isolada das folhas de *Schinus terebinthifolius* de aumentar a ação bactericida de macrófagos de ratos infectados por *Staphylococcus aureus* (DE SOUZA FEITOSA LIMA et al., 2019).

O papel das lectinas encontradas em animais na proteção contra micro-organismos também vem sendo investigado. Su e colaboradores (2020) demonstraram que a lectina encontrada na espécie de caranguejo *Portunus trituberculatus* desempenha papel de reconhecimento, opsonização e eliminação de patógenos (SU et al., 2020). Do mesmo modo, a lectina encontrada no peixe *Ctenopharyngodon idella* garante ao organismo proteção contra infecção pela bactéria *Aeromonas hydrophila* (LIU; DANG, 2020).

Diversas aplicações biotecnológicas das lectinas também já foram bastante estudadas, como, por exemplo, seu uso como adjuvante terapêutico. A lectina de *Dioclea violacea* é capaz de aumentar o efeito antibiótico da gentamicina, além de diminuir a nefrotoxicidade dessa droga (SANTOS et al., 2019). Em outro estudo, foi encontrado que a lectina da semente de *Butea monosperma* auxilia diversos antibióticos e nanopartículas a eliminar biofilme de *Escherichia coli* uropatogênica (SUBRAMANIYAN et al., 2019). Lectinas também podem desempenhar papel de carreadores de medicamentos (DE OLIVEIRA FIGUEIROA et al., 2017), como, por exemplo, lipossomos modificados com a lectina Concanavalina A, que podem servir como carreadores de fármacos para células-alvo (BAKOWSKY et al., 2008).

Muitas outras atividades biológicas das lectinas foram demonstradas, como capacidade de combater câncer colorretal humano e melanoma de camundongo (PETROVIĆ et al., 2020), diferenciação e proliferação celular (PEUMANS; VAN DAMME, 1995), capacidade de aglutinação (GOLDSTEIN; HUGHES; AL., 1980), tipagem sanguínea (KHAN et al., 2002), indução de formação de vacúolos em macrófagos (GOLDMAN; SHARON; LOTAN, 1976), imunossupressão (LEE; NALINI; KIM, 2008), reconhecimento de micro-organismos (ALLAM; RAFTOS, 2015; MEDZHITOV, 2007; WATANABE et al., 2006), dentre muitas outras.



Por serem bastante diversas, tanto em relação às suas estruturas quanto às especificidades, as lectinas são subdivididas em quatro classes, são elas: merolectinas, que possuem um único domínio ligante a carboidratos, e, por serem monovalentes, não precipitam glicoconjugados e nem aglutinam células; hololectinas, que englobam a maior parte das lectinas vegetais, possuem pelo menos dois domínios de ligação a carboidratos semelhantes, são multivalentes e possuem a capacidade de aglutinar células e precipitar glicoconjugados; quimerolectinas, que possuem um ou mais domínios de ligação a carboidratos e um outro domínio de função distinta e independente, com atividade enzimática ou outra atividade biológica; e superlectinas, que, assim como as hololectinas, possuem pelo menos dois domínios de ligação a carboidratos, mas, diferentemente da outra classe, esses domínios reconhecem açúcares estruturalmente diferentes (VAN DAMME et al., 1998).

As lectinas vegetais são as mais estudadas, especialmente as encontradas nas plantas leguminosas (Fabaceae). As lectinas dessa família apresentam sequências de aminoácidos semelhantes, entretanto diferem na especificidade de ligação a hidratos de carbono (VAN DAMME et al., 1998). As lectinas da subtribo Diocleae, que engloba 13 gêneros de leguminosas (*Canavalia*, *Cleobulia*, *Cymbosema*, *Dioclea*, *Macropsychanthus*, *Bionia*, *Camptosema*, *Collaea*, *Cratylia*, *Galactia*, *Lackeya*, *Neorudolphia* e *Rhodopis*) (DE QUEIROZ et al., 2015) possuem estruturas semelhantes, tendo principal característica a capacidade de reconhecer os carboidratos manose e glicose (CAVADA et al., 2001). Embora essas lectinas possuam afinidade pelos menos carboidratos, pequenas diferenças nas sequências primárias de aminoácidos podem gerar divergências nas suas especificidades e atividades biológicas (RAMOS et al., 2002).

Uma das espécies pertencentes à subtribo Diocleae é a *Cratylia argentea* (Desv.) Kuntze, uma planta arbustiva leguminosa, pertencente à família Fabaceae. Ela é nativa do Cerrado, com ocorrência na América do Sul, na Bolívia, Peru e Brasil, sendo encontrada nos estados do Ceará, Goiás, Mato Grosso, Pará, Piauí e Tocantins (QUEIROZ, 2015). É uma espécie arbustiva, adaptada à seca e baixa fertilidade do solo, permanecendo verde o ano inteiro. É bastante utilizada como silagem, forragem ou suplementação na alimentação de ruminantes devido à sua ampla distribuição e resistência a condições ambientais adversas, além de ser rica em proteínas e taninos, polifenóis vegetais que desempenham papel de proteção contra herbivoria de

pequenos vertebrados e invertebrados, mas que, quando ingeridos por ruminantes, podem auxiliar na eliminação de nematódeos gastrointestinais (DA SILVA et al., 2017; VON SON-DE FERNEX et al., 2012). Também é utilizada como fertilizante em plantações e em recuperação de ambientes degradados, pois é capaz de aumentar a disponibilidade de nitrogênio e matéria orgânica do solo (COBO et al., 2002).

A lectina dessa planta, denominada CFL (nomenclatura que faz referência ao seu sinônimo botânico, *Cratylia floribunda*), é uma hololectina composta por três cadeias proteicas com 25,3 Da (cadeia  $\alpha$ ), 12,8 Da (cadeia  $\beta$ ) e 12,5 Da (cadeia  $\gamma$ ) (CALVETE et al., 1999). Essa lectina pode ser isolada por cromatografia em coluna sephadex-G50, podendo ser eluída com soluções tampão de glicose ou manose, carboidratos com os quais possui afinidade (BARRAL-NETO et al., 1992; OLIVEIRA; CAVADA; MOREIRA, 1991; RODRIGUEZ et al., 1992).

A atividade biológica da lectina CFL já foi demonstrada em alguns estudos. Essa lectina possui efeito citotóxico e genotóxico em células tumorais, provocando apoptose e dano no DNA de células de câncer de mama (FAHEINA-MARTINS et al., 2011); possui ação anti-inflamatória em edema de pata em ratos (ASSREUY et al., 1997); é tóxica para *Biomphalaria glabrata* e *Artemia salina*, sendo uma alternativa para o controle de vetores de doenças (SANTOS et al., 2010), além de estimular a secreção de histamina em mastócitos peritoneais de ratos (GOMES et al., 1994) e possuir efeito calurético, aumentando a hemodinâmica renal em ratos (HAVT et al., 2015). Num estudo que avaliou camundongos alimentados com a lectina CFL, foi observado que a lectina é resistente a proteólise intestinal, se liga ao epitélio do intestino e provoca um aumento do intestino delgado, cécum, cólon, rins e pâncreas, além de diminuir a taxa de crescimento e prejudicar a digestão nos animais (OLIVEIRA et al., 2004), corroborando com estudos que demonstraram o papel de lectinas na proteção contra herbivoria das plantas (DE SOUZA CÂNDIDO et al., 2011; MICHIELS; VAN DAMME; SMAGGHE, 2010; VANDENBORRE; SMAGGHE; VAN DAMME, 2011).

Entretanto, há poucos estudos acerca do efeito antiinfecioso dessa lectina, sendo apenas demonstrada seu potencial de combater infecção por *Salmonella enterica*. Em estudo de nosso grupo de pesquisa, camundongos infectados tratados com a lectina CFL tiveram taxa de sobrevivência entre 70% e 100%, enquanto animais não tratados morreram entre 1 e 6 dias. Além disso, a carga bacteriana foi significativamente

reduzida na cavidade peritoneal, sangue, baço e fígado dos animais tratados com a lectina. Também foi observado que animais não infectados tratados com a lectina apresentaram infiltração de leucócitos na cavidade peritoneal e linfocitopenia, e, após 3 dias de infecção, houve um aumento na quantidade de leucócitos e linfócitos (SILVA et al., 2016). Em ensaio *in vitro*, foi observado que a lectina CFL foi capaz de reduzir a carga bacteriana intracelular de macrófagos peritoneais de camundongos, além de induzir a expressão de IL-12 e TLR-4, receptor do tipo Toll responsável pela detecção de patógenos. Em macrófagos previamente tratados com a lectina, observou-se um aumento da expressão de IL-6 e TNF- $\alpha$ , citocinas pró-inflamatórias, após a infecção (BATISTA et al., 2017).

## 2.2. Resposta imune contra infecções bacterianas

O combate do organismo hospedeiro contra infecções bacterianas se dá pela resposta imune, inata ou adaptativa, a partir do reconhecimento dos micro-organismos. Na resposta inata, essa identificação se dá por meio de estruturas moleculares produzidas pelos agentes microbianos e que são compartilhadas por classes de micro-organismos, os chamados padrões moleculares associados ao patógeno (PAMPs). Diferentes classes de micro-organismos possuem PAMPs específicos. Bactérias Gram-positivas possuem como PAMPs específicos os peptidoglicanos que constituem sua parede celular, enquanto os padrões específicos das bactérias Gram-negativas são os lipopolissacarídeos (LPS) de sua membrana (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015).

A inflamação, uma das principais respostas, se dá pelo recrutamento de leucócitos (fagócitos, neutrófilos e monócitos) e proteínas plasmáticas do sangue, acumulados nos tecidos e ativados para a destruição dos micro-organismos (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015). Na resposta imune inata, os fagócitos irão ingerir esses micro-organismos e destruí-los em suas vesículas intracelulares. A resposta adaptativa possui mecanismos mais potentes e especializados para combater os patógenos adaptados e resistentes à resposta inata. As células apresentadoras de antígenos, como por exemplo os macrófagos, irão reconhecer e fagocitar esses invasores, apresentando seus antígenos para os linfócitos T, dando início à resposta adaptativa (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015).

As citocinas, pequenas proteínas liberadas por células e que, através de receptores, regulam crescimento, maturação e respostas de determinados grupos de células, estão envolvidas nesses mecanismos. Elas são produzidas por vários tipos de células, incluindo células do sistema imunológico, em especial as células T auxiliares e os macrófagos, e se ligam a receptores de superfície, desencadeando expressão gênica na célula alvo (RAMANI et al., 2015; ZHANG; AN, 2009).

Como a interação das lectinas vegetais com carboidratos de membrana das células do sistema imunológico pode induzir a produção de citocinas, as lectinas poderiam potencialmente ser utilizadas como adjuvantes terapêuticos, auxiliando no controle de infecções por micro-organismos por meio da modulação da resposta imunológica do hospedeiro. As lectinas podem desencadear dois tipos de resposta celular: o tipo 1 (Th1), caracterizado pela liberação das citocinas interferon-gama (INF- $\gamma$ ), fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), e interleucina-2 (IL-2), efetivas no combate de infecções por micro-organismos no interior de macrófagos; e o tipo 2 (Th2), onde ocorre a liberação das interleucinas IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13, envolvidas na produção de anticorpos e ativação de eosinófilos, em reação contra alérgenos e helmintos (ROMAGNANI, 2007).

### 2.3. *Listeria monocytogenes*

*Listeria monocytogenes* é uma bactéria da família Listeriaceae, Gram-positiva, parasita intracelular facultativa, anaeróbia facultativa, causadora da listeriose, infecção bacteriana que acomete mamíferos e aves. Possui forma de bacilo curto, com dimensões que variam entre 0,5 e 2  $\mu\text{m}$  de comprimento e 0,5  $\mu\text{m}$  de diâmetro (JAMSHIDI; ZEINALI, 2019). Amplamente distribuída na natureza, pode ser encontrada no solo, vegetação, água e em animais. Foi primeiro descrita em 1926 por Murray e colaboradores (MURRAY E. G. D., WEBB R. A., SWANN, 1926), ao isolarem num surto epizootico de coelhos uma bactéria Gram-positiva em forma de bastonete não esporulante. Denominaram a bactéria de *Bacterium monocytogenes* por observarem que ela infectava monócitos. Em 1940, Pirie isolou a bactéria a partir de um roedor selvagem no Norte da África e a denominou *Listerella hepatolytica* (PIRIE, 1940). Quando se descobriu que os dois isolados se tratavam da mesma espécie, criou-se a denominação *Listeria monocytogenes* (RYSER; MARTH, 2007).

Por ser capaz de se proliferar em uma grande faixa de temperatura (com faixa de crescimento entre 30 e 37 °C, mas capaz de sobreviver entre 0 e 45 °C), ser resistente a temperatura de refrigeradores, a desinfetantes e capaz de se aderir a diversos tipos de superfícies, apresenta alto risco de contaminação em diversos tipos de alimentos (MELONI, 2014; RAMASWAMY et al., 2007; SAUER; HERSKOVITS; O'RIORDAN, 2019), sendo a ingestão de alimentos contaminados a maior fonte de transmissão para humanos (MARQUIS et al., 2016). Dessa forma, a bactéria é uma das principais preocupações da indústria alimentícia, já que, uma vez introduzida numa unidade de processamento de alimentos, considerando sua resistência a condições adversas, sua eliminação é bastante difícil (VÁZQUEZ-BOLAND et al., 2001).

Apesar de não produzir esporos de resistência, *L. monocytogenes* é resistente à diversas condições ambientais estressantes, como alta variação na temperatura, salinidade e pH (FREITAG; PORT; MINER, 2009). A tolerância térmica da bactéria é maior do que outras bactérias não esporulantes, e pode aumentar após exposição a condições estressantes, como alta temperatura e choque osmótico (MELONI, 2014). Possuem crescimento ótimo em pH 8,0, entretanto, na ausência de outros fatores limitantes, essa bactéria é capaz de crescer em ambientes com pH entre 5,6 e 8,0 (RYSER; MARTH, 2007). A exposição a pH mais baixo pode levar a um aumento da tolerância para acidez, e, indiretamente, proteção contra choque osmótico (MELONI, 2014). *L. monocytogenes* tem a maior taxa de crescimento em concentrações de NaCl a 6,5%, mas pode crescer com a concentração chegando a 12%. Além disso, pode crescer e se multiplicar na concentração de até 70% de CO<sub>2</sub> numa temperatura de -7 °C (MELONI, 2014).

Além disso, a bactéria causadora da listeriose possui diversos mecanismos adaptativos que a fazem resistente contra respostas imunológicas do hospedeiro, garantindo sobrevivência nas condições adversas do trato gastrointestinal e no interior de macrófagos, além de ser capaz de adquirir resistência contra antibióticos (MARQUIS et al., 2016).

## 2.4. Listeriose

O gênero *Listeria* possui seis espécies, são elas: *L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. seeligeri*, *L. innocua*, *L. welshimeri*, e *L. grayi*. Dentre elas, apenas as duas primeiras são patogênicas (VÁZQUEZ-BOLAND et al., 2001), provocando uma doença responsável por infecções localizadas e generalizadas em humanos e diversos outros animais. Apesar da bactéria *L. monocytogenes* ser amplamente distribuída na natureza, a principal causa de listeriose em humanos e animais domésticos é a ingestão por alimentos contaminados, principalmente derivados de leite, saladas e alimentos refrigerados e congelados. Nos animais, na maioria dos casos, a doença é caracterizada por septicemia, abscessos viscerais múltiplos e meningoencefalite (RAMASWAMY et al., 2007). É uma grande causadora de infecções em animais de pasto, que, quando infectados, liberam a bactéria nas fezes, secreções nasais e leite (BARBUDDHE et al., 2012). *L. monocytogenes* é estudada muito antes de sua importância econômica ser elucidada, pois desde a descoberta de que essa bactéria é capaz de sobreviver e se multiplicar no interior de macrófagos (MACHESKY, 1997), ela passou a ser utilizada como modelo de estudos sobre infecções parasitárias intracelulares (MACKANESS, 1962, 1969; MIKI; MACKANESS, 1964; NORTH, 1970, 1978).

O grau de infecção por *L. monocytogenes* depende principalmente da virulência da estirpe, da quantidade de células bacterianas ingeridas e do estado imunitário do hospedeiro, sendo o grupo mais susceptível o de mulheres grávidas, recém-nascidos, idosos e indivíduos imunodeprimidos (RAMASWAMY et al., 2007), mas dados epidemiológicos sugerem que o número mínimo de células capazes de provocar a doença é de  $10^6$  Unidades Formadoras de Colônia (UFC) por grama. Apesar de ter baixa incidência em humanos, é uma doença com alta taxa de mortalidade, com uma média de mortalidade de 20 a 30% (MCLAUHLIN, 1990), chegando a 70% em pacientes do grupo de risco (LORBER, 1997). Mulheres grávidas são as mais afetadas, num estudo que envolveu 20 países, foi apontado que 43% dos casos de listeriose estão vinculados à gravidez (MATEUS et al., 2013).

Nos Estados Unidos, *L. monocytogenes* está relacionada a 19% das mortes em humanos causadas por ingestão de alimentos contaminados (SCALLAN et al., 2011), sendo listeriose a doença com maior porcentagem de casos com mortalidade entre as doenças causadas por ingestão de alimentos contaminados. Na Europa, listeriose é a

quarta zoonose mais comum, com 0,41 casos por ano a cada 100 mil habitantes, além disso, a taxa de transmissão de mães para recém-nascidos foi registrada em 79% dos casos. Na Índia, *L. monocytogenes* vem sendo apontada como um dos causadores de abortos espontâneos e natimorto (EFSA; ECDC, 2016). No caso de surtos da doença em bovinos, caprinos e ovinos, a mortalidade pode chegar a 100% (BUNDRANT et al., 2011). Apesar de se tratar de um micro-organismo de grande importância, tendo em vista seus impactos na saúde pública e na economia, no Brasil não há estatísticas oficiais sobre casos de listeriose, pois sua notificação não é obrigatória (SUSANA et al., 2017).

O tratamento da doença, que pode causar aborto, meningite, diarreia, gastroenterite e septicemia (LORBER, 1997), é feito com antibióticos, como ampicilina, gentamicina, eritromicina, vancomicina, penicilina, rifampicina ou cotrimoxazol, entretanto, essa bactéria é resistente a antibióticos das classes fluoroquinolonas e cefalosporinas (GÓMEZ et al., 2014; SEVEAU, 2014), além de já ter sido documentado ocorrências de cepas resistentes a diversos antibióticos, como penicilina, ampicilina, eritromicina, vancomicina, amoxicilina, clindamicina (BASHA et al., 2019; ŞANLIBABA; TEZEL; ÇAKMAK, 2018b; SERENO et al., 2019; SKOWRON et al., 2019; SOUZA; TEBALDI; PICCOLI, 2015; WELEKIDAN et al., 2019). Em casos clínicos menos frequentes, a infecção pode levar à endocardite, miocardite, artrite, pneumonia, hepatite, pleurisia, colecistite, peritonite, abscessos localizados, osteomielite, sinusite, otite, conjuntivite e, em vacas, mastite (FARBER; PETERKIN, 1991; GAUTO et al., 1992; LORBER, 1997; LOW; DONACHIE, 1997; MCLAUCHLIN, 1990).

## 2.5. Processo infeccioso

Ao ser ingerida, *L. monocytogenes* precisa sobreviver à acidez do estômago, a primeira barreira do organismo hospedeiro contra o invasor. Estudos demonstraram que o uso de antiácidos pode ser um fator de risco para listeriose (HO et al., 1986). No intestino, a bactéria irá penetrar o hospedeiro pelo epitélio intestinal (RÁCZ; TENNER; MÉRÖ, 1972). A partir de linfonodos mesentéricos, a bactéria se desloca para o baço e fígado (MOREIRA et al., 1991). Em seguida, *L. monocytogenes* irá invadir e se reproduzir dentro de células de tecido do hospedeiro, incluindo células

não fagocíticas e glóbulos brancos (LECUIT, 2007; MAURY et al., 2016), através da interação de moléculas ligantes presentes na superfície da bactéria com receptores de superfície das células do hospedeiro (MENGAUD et al., 1996). Dentro da célula hospedeira, a bactéria evita as respostas do sistema imune adaptativo (VÁZQUEZ-BOLAND et al., 2001).

Essa facilidade da bactéria em penetrar células do hospedeiro se dá pela presença de invasinas, proteínas associadas à penetração de patógenos em células hospedeiras. As invasinas de superfície expressas por *L. monocytogenes* são chamadas de internalina A (InA) e internalina B (InB) (POSFAY-BARBE; WALD, 2009). InA é altamente específica para o receptor E-caderina, encontrado na superfície de células epiteliais humanas, bastante expressa no lúmen do intestino, porta de entrada para a bactéria. Já a InB permite a bactéria invadir células como hepatócitos, fibroblastos e macrófagos (LECUIT et al., 1997).

Os neutrófilos são as primeiras células recrutadas para o local de infecção. Uma vez infectados, secretam a citocina IL-12, que irá aumentar a secreção de IFN- $\gamma$  pelas células NK, e, conseqüentemente, ativar macrófagos e células dendríticas (RUBY et al., 2012). Os macrófagos secretam mediadores da inflamação, como TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, IL-8 e óxido nítrico, provocando respostas imunes específicas e não-específicas contra a invasão (FRACASSO, 2008).

Macrófagos ativados infectados por *L. monocytogenes* produzem as citocinas IL-12 e IL-18, responsáveis pela ativação de células NK (células assassinas naturais), que, por sua vez, produzem IFN- $\gamma$  (KANG et al., 2008), estimulando assim a produção de TNF- $\alpha$  e NO (óxido nítrico), este capaz de destruir a maior parte das bactérias no ambiente intracelular (SERBINA et al., 2003). Entretanto, a bactéria possui mecanismos para penetrar os macrófagos e escapar dos mecanismos de defesa do hospedeiro.

Após ter sido fagocitada, *L. monocytogenes* libera uma citolisina chamada listeriolisina O (LLO), uma proteína capaz de formar poros na parede do vacúolo, permitindo a saída desse micro-organismo para o citosol. No citosol, a bactéria, por meio de seus produtos gênicos, irá estimular a produção de IFN-I (Interferon I), esse capaz de diminuir a regulação de receptores de IFN- $\gamma$ , diminuindo a habilidade dessa citocina de ativar monócitos. Outro fator de virulência de *L. monocytogenes* é o gene Act A, que permite a bactéria utilizar componentes do citoesqueleto da célula



hospedeira para se locomover e infectar células vizinhas (POSFAY-BARBE; WALD, 2009). A bactéria também consegue se proteger da acidez do estômago e dos sais biliares, por meio de sistemas que sequestram e convertem moléculas para manter o pH do citoplasma próximo a neutro, num meio extracelular ácido, e genes regulados por sais biliares que a permitem bombear os sais biliares para fora ou catabolizá-los (QUILLIN; SCHWARTZ; LEBER, 2011; SLEATOR et al., 2005). Além disso, *L. monocytogenes* é capaz de se proteger da ligação de peptídeos antimicrobianos ao modular carga iônica no envelope celular (MARQUIS et al., 2016).

Desse modo, considerando a resistência de *L. monocytogenes* à diversas condições ambientais, respostas de defesa do hospedeiro e medicamentos, pesquisas de novos produtos que sirvam como adjuvantes terapêuticos se fazem cada vez mais necessárias.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Objetivo geral

Avaliar o potencial da lectina CFL na ativação de mediadores inflamatórios envolvidos com o controle da infecção intracelular de *Listeria monocytogenes* em camundongos.

#### 3.2. Objetivos específicos

- Avaliar a influência da lectina CFL na depuração de *L. monocytogenes* no sangue, fluido peritoneal, baço, fígado e pulmão de camundongos Swiss infectados por *L. monocytogenes*;
- Avaliar a influência da lectina CFL na depuração bacteriana intracelular em macrófagos intraperitoneais infectados por *L. monocytogenes*;
- Avaliar a influência da lectina CFL na migração de leucócitos no sangue e fluido peritoneal dos animais infectados;
- Avaliar a influência da lectina CFL na prevenção de danos histológicos da infecção no baço, fígado e pulmão dos animais;
- Determinar a influência da lectina CFL na expressão gênica das citocinas TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-10 e da enzima iNOS no baço de camundongos infectados por *L. monocytogenes*;
- Verificar a ação antimicrobiana direta da lectina CFL contra *L. monocytogenes*.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

Todos os ensaios que envolveram experimentação animal foram conduzidos de acordo com as normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal Rural de Pernambuco (CEUA-UFRPE 024/2014).

### 4.1. Animais

Foram utilizados 32 camundongos Swiss (*Mus musculus*), fêmeas adultas, com peso entre 30 e 40 gramas, provenientes do biotério do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA) da Universidade Federal de Pernambuco. Os animais foram mantidos em gaiolas com livre demanda de água e ração, com iluminação controlada em ciclos de 12 horas claro/escuro. Os ensaios foram realizados em duas etapas, com 16 animais cada.

Para a realização dos ensaios, os animais foram divididos em quatro grupos, com quatro animais cada, sendo eles:

- I. Animais não tratados e não infectados;
- II. Animais tratados e não infectados;
- III. Animais não tratados e infectados;
- IV. Animais tratados e infectados.

### 4.2. Obtenção da lectina CFL

Com apoio da equipe do Professor Márcio Viana Ramos, do Laboratório de Bioquímica Vegetal da Universidade Federal do Ceará (UFC), as lectinas foram obtidas de amostras de *Cratylia argentea* (sinônimo: *C. floribunda* e *Dioclea argentea*) coletadas no Estado do Ceará. A identidade taxonômica do material botânico foi confirmada por especialistas do Herbário Prisco Bezerra, da UFC. A lectina foi extraída e purificada das sementes, seguindo o protocolo descrito por Oliveira et al. (OLIVEIRA; CAVADA; MOREIRA, 1991), e obtida através de cromatografia de afinidade em coluna de Sephadex G-50. Após diálise contra água destilada, as

proteínas foram liofilizadas e submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida a 12.5% (SDS-PAGE). Para determinação de suas sequências de aminoácidos, CFL foi submetida à degradação de Edman, em equipamento Shimadzu PPSQ. A contaminação por LPS da lectina foi descartada por meio do ensaio Endosafe-PTS, seguindo o protocolo descrito pelo fabricante (Charles River-UK). Soluções estoque da lectina CFL foram preparadas em PBS (tampão fosfato-salino) para uso nos experimentos nas concentrações de 0,1 mg/kg e 10 mg/kg.

#### 4.3. Micro-organismo

Foi utilizada nos experimentos uma cepa de *L. monocytogenes* (cepa 619) patogênica, isolada de um caso clínico humano, cedida gentilmente pela pesquisadora Dra. Nilma Cintra Leal do Instituto Aggeu Magalhães/FIOCRUZ, Recife – PE. Tais bactérias foram mantidas congeladas a -20 °C em glicerol 10% e reativadas por incubação *overnight* em caldo enriquecido seletivo para *Listeria* para uso nos experimentos. As culturas foram ajustadas em espectrofotômetro a 630 nm, considerando a densidade óptica de 0.5 correspondente a  $10^8$  células/mL.

#### 4.4. Infecção experimental

As culturas de *L. monocytogenes* suspensas em caldo foram centrifugadas a 4.000 rpm por 10 minutos numa temperatura de 15°C e o precipitado foi suspenso em 5 mL de PBS, previamente aquecido em banho-maria na temperatura de 37 °C. A concentração bacteriana foi ajustada para  $1 \times 10^7$  Unidades Formadoras de Colônias/mL (UFC/mL). Em seguida, 300 µl dessa suspensão bacteriana foram injetados nos animais dos grupos a serem infectados (grupos III e IV) via intraperitoneal. Nos grupos não infectados foram injetados 300 µl de PBS. Os animais foram mantidos nas gaiolas, com livre acesso à água e ração.

#### 4.5. Tratamento com a lectina

Após 30 minutos do inóculo bacteriano, foram injetados 300 µl da lectina CFL nas diferentes concentrações (0,1 ou 10 mg/kg) nos animais dos grupos com tratamento (II e IV), por meio da veia caudal. Nos grupos sem tratamento, foram

inoculados, igualmente através da veia caudal, 300 µl de PBS. Os animais foram mantidos em suas gaiolas por 24 horas até o momento da eutanásia.

#### 4.6. Coleta de amostras

A eutanásia dos animais foi realizada por meio de inalação de Isoflurano. Em seguida, foram retirados, lavados com PBS e pesados o baço, fígado e pulmão. Esses órgãos foram divididos em duas frações, destinadas a quantificação de UFC e análises histológicas. Contudo, do baço, uma terceira fração foi destinada à extração de RNA. Também foram retiradas amostras de sangue e fluído peritoneal para contagem de bactérias e leucócitos. Macrófagos intraperitoneais foram coletados para quantificação de bactérias intracelulares, como descrito abaixo.

#### 4.7. Quantificação bacteriana

Os fragmentos dos órgãos foram devidamente pesados, macerados e posteriormente diluídos em PBS e inoculados em placas de Petri com meio de cultura ágar Mueller Hinton pelo método *pour plate*. Amostras de sangue e fluido peritoneal dos animais também foram retiradas e inoculadas em meio de cultura. As placas foram incubadas em estufa por 72 horas. Após esse período, o número de UFC/mL de *L. monocytogenes* nas placas inoculadas com amostras dos órgãos, fluido peritoneal, sangue e macrófagos intraperitoneais dos animais de todos os grupos foi quantificado.

Para quantificação bacteriana intracelular, macrófagos foram coletados por meio de lavagem da cavidade peritoneal com 5 mL de PBS, incubados por 24 horas em placa de cultura de 96 poços (200 µl/poço) em estufa à 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub> para adesão das células. Os poços foram então lavados e tratados com gentamicina por 1 hora para eliminação das bactérias presentes no meio extracelular. Em seguida, foram adicionados aos poços 200 µl de Triton X-100 0,2% e a placa incubada em geladeira por 20 minutos, para provocar a lise dos macrófagos e a liberação das bactérias que sofreram fagocitose. Para quantificação das bactérias, 20 µL dos lisados celulares foram coletados para realização de diluições decimais e semeados em placas com ágar seletivo para *Listeria* em estufa por 24 horas.

#### 4.8. Contagem total e diferencial de leucócitos

Para contagem total de leucócitos no sangue periférico, 20  $\mu\text{L}$  de sangue foram coletados por punção cardíaca, em seguida diluídos e homogeneizados em 380  $\mu\text{L}$  de reagente de Turk. Uma alíquota desta solução foi submetida a contagem em câmara de Neubauer com auxílio de microscópio óptico. A contagem total de leucócitos presentes no fluido peritoneal foi realizada conforme descrito para a contagem total de leucócitos do sangue.

Para a contagem diferencial de leucócitos do fluido peritoneal foi realizado um esfregaço corado com panótico rápido. Em seguida, os linfócitos, neutrófilos, basófilos, eosinófilos e monócitos foram contados em microscópio óptico. Os resultados foram expressos como a média  $\pm$  erro padrão médio de células  $\times 10^3$  células/ $\text{mm}^3$  de sangue.

#### 4.9. Histopatologia

Os fragmentos dos órgãos destinados a análises histopatológicas foram imersos em formol tamponado à 10% por 24 horas e em seguida transferidos para álcool 70%, onde permaneceram armazenados até a realização das análises.

Após a fixação do material, as amostras foram desidratadas em etanol, clarificadas em xilol e, em seguida, foi realizada a inclusão em parafina. Os blocos de parafina foram cortados com auxílio de micrótomo e os cortes dos tecidos foram montados em lâminas de vidro. As lâminas foram então lavadas para a eliminação da parafina e coradas com hematoxilina e eosina (HE).

A leitura das lâminas em microscópio óptico foi realizada por um especialista.

#### 4.10. Análise de expressão gênica de citocinas

Para extração do RNA total, as frações de baço foram lavadas com PBS e, a seguir, foram maceradas e homogeneizadas com 500  $\mu\text{L}$  de reagente TRIzol (Invitrogen) para lise química das células, seguindo o protocolo fornecido pelo fabricante. Após etapas de extração com clorofórmio e precipitação com isopropanol, o RNA total obtido foi utilizado como molde para síntese de DNA complementar

(cDNA), utilizando-se um kit comercial (Sigma M-MLV Reverse Transcriptase). As reações em RT-qPCR foram realizadas utilizando-se Gotaq-qPCR Master Mix (Promega) conforme instruções do fabricante. As amplificações dos transcritos (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10 e iNOS) foram analisadas com primers específicos e o controle interno de amplificação feito com Gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase (GAPDH). A condição da reação de RT-qPCR foi feita com as seguintes condições: 95°C / 15 segundos, 60°C / 60 segundos (Rotor Gene Q series - Qiagen), em reações com volumes de 20  $\mu$ l. Os resultados foram analisados segundo Dussault e Pouliot (DUSSAULT; POULIOT, 2006), segundo a seguinte fórmula:

$$\Delta\Delta Ct = [(Ct_{GIControle} - Ct_{ACTControle}) - (Ct_{GIExperimental} - Ct_{ACTExperimental})]$$

Onde GI representa os valores de Ct (Cycle Threshold) dos genes de interesse expressos no grupo experimental (estimulados e tratado com a lectina), cujos resultados expressam a variação relativa aos grupos controles utilizando a fórmula  $2^{\Delta\Delta Ct}$ .

#### 4.11. Ação antimicrobiana direta

Considerando o potencial imunomodulador da lectina CFL, também foi verificado sua capacidade de provocar um efeito antimicrobiano diretamente nas culturas de *L. monocytogenes in vitro*. Culturas de *L. monocytogenes* foram diluídas em caldo Mueller Hinton e ajustadas para a concentração de  $5 \times 10^4$  células/mL. Em seguida, as suspensões bacterianas foram transferidas para placas de cultura de 96 poços (200  $\mu$ l/poço), e submetidas a tratamento com a lectina CFL a 10  $\mu$ g/mL e 1 mg/mL por 24 horas em estufa a 37 °C. Como controle foram utilizadas suspensões bacterianas não tratadas. Após o tempo de tratamento, 20  $\mu$ l das suspensões bacterianas foram coletados para realização de diluições decimais e semeados em placas com ágar seletivo para *Listeria* em estufa por 24 horas para quantificação bacteriana. Além disso, também foi realizada leitura em espectrofotômetro no comprimento de onda de 630 nm.

#### 4.12. Estatística

Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. As diferenças estatísticas entre os grupos foram obtidas por análises de variância (ANOVA) seguidas pelo teste de Bonferroni com intervalo de confiança de  $P < 0.05$ . As análises foram realizadas e os gráficos correspondentes obtidos utilizando-se o programa GraphPad Prism versão 8.0.1.



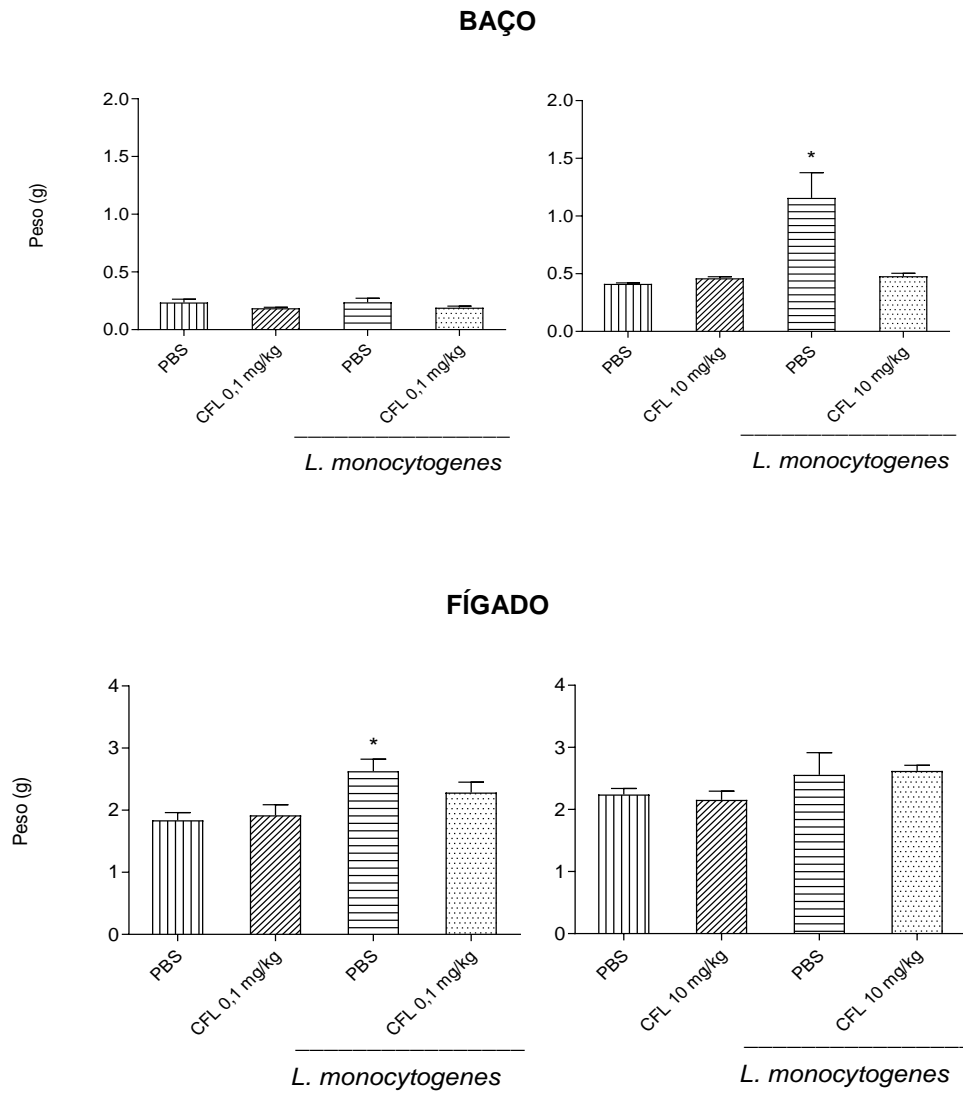
## 5. RESULTADOS

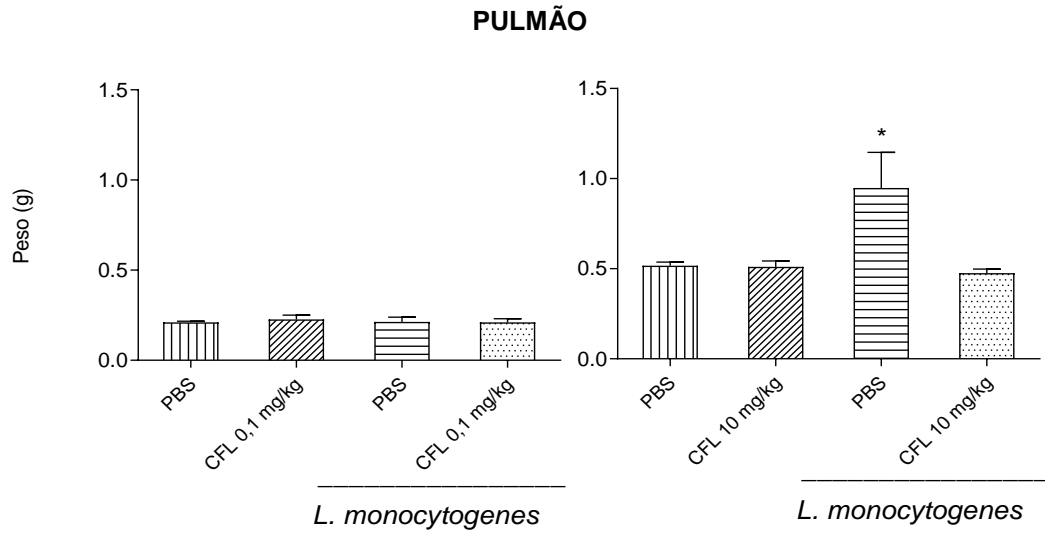
Observou-se um aumento no peso médio do baço e pulmão dos animais infectados por *L. monocytogenes* e não tratados. Quando submetidos ao tratamento com a lectina CFL na concentração de 10 mg/kg, o baço e pulmão dos animais infectados mantiveram-se com os pesos normais, semelhantes aos órgãos dos animais não infectados (Figura 1). No ensaio com a lectina na concentração de 0,1 mg/kg observou-se um aumento do fígado nos animais infectados não tratados (Figura 1). O tratamento com a lectina nessa concentração foi capaz de manter o peso normal do órgão.

De modo semelhante, o tratamento com a lectina CFL a 10 mg/kg provocou redução significativa ( $p < 0,05$ ) na carga bacteriana do baço, fígado e sangue dos animais dos grupos infectados por *L. monocytogenes* (Figuras 2 e 3). Já no pulmão e fluido peritoneal coletado dos animais infectados, não foi observada diferença significativa na contagem de UFC entre os grupos tratados e não tratados com a lectina (Figuras 2 e 3). O tratamento com a lectina CFL na concentração menor (0,1 mg/kg) não foi capaz de provocar diminuição de UFC nos órgãos analisados (Figuras 2 e 3).

Os ensaios mostraram que os macrófagos peritoneais dos animais infectados com *L. monocytogenes* e tratados com a lectina CFL na concentração de 10 mg/kg foram capazes de provocar uma redução de 6 vezes no número de bactérias intracelulares, enquanto os macrófagos provenientes dos animais tratados com a lectina na menor concentração não obtiveram sucesso em reduzir a carga bacteriana intracelular (Figura 4).

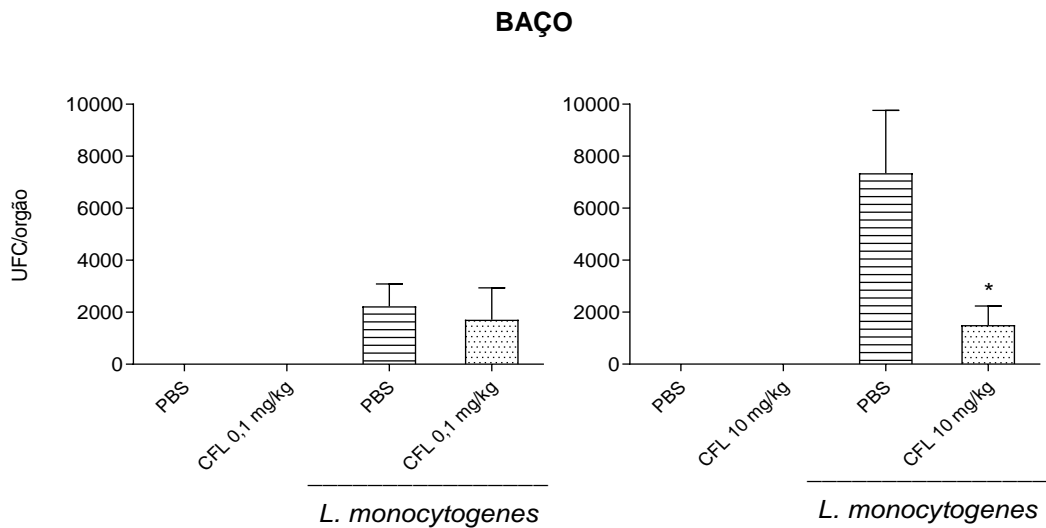
**FIGURA 1.** Peso médio dos órgãos dos camundongos tratados com a lectina CFL e infectados com *Listeria monocytogenes*.



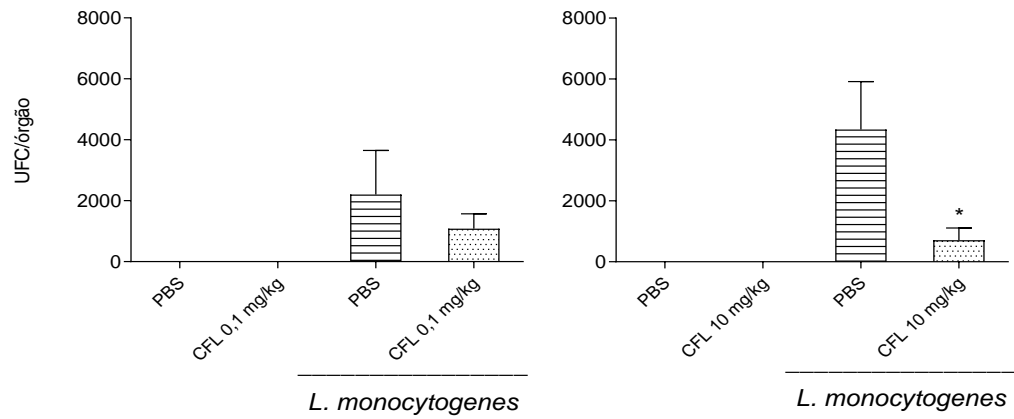


\* indica diferença significativa em relação ao grupo controle não infectado e não tratado, com  $p < 0,05$  de acordo com o teste ANOVA seguido pelo pós-teste de Bonferroni.

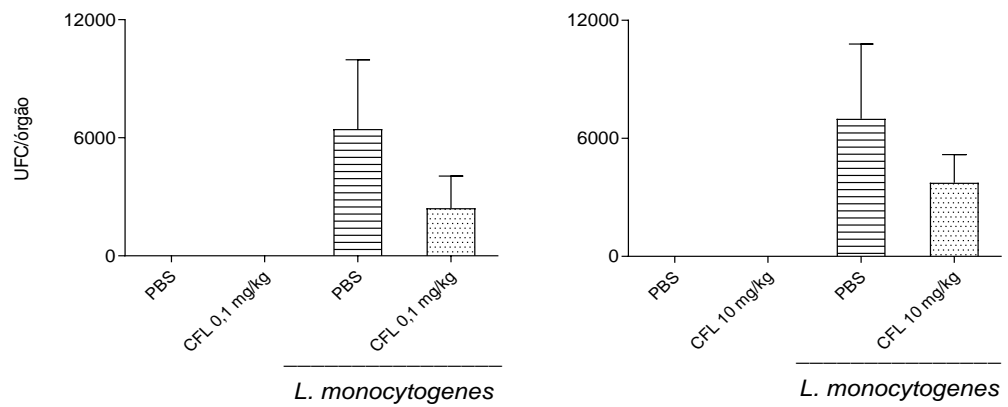
**FIGURA 2.** Quantificação de bactérias em órgãos de camundongos tratados com CFL e infectados com *Listeria monocytogenes*.



### FÍGADO

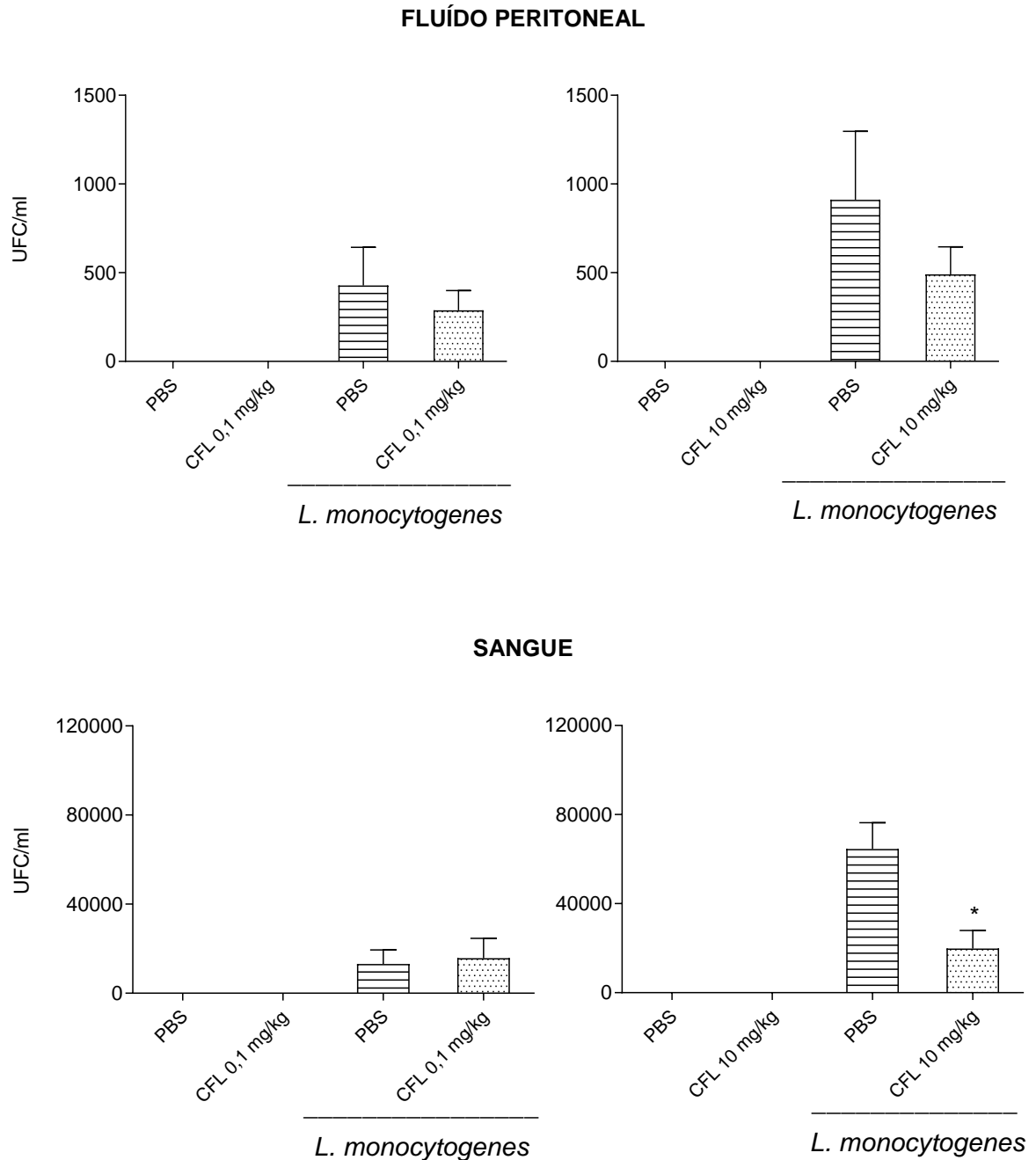


### PULMÃO



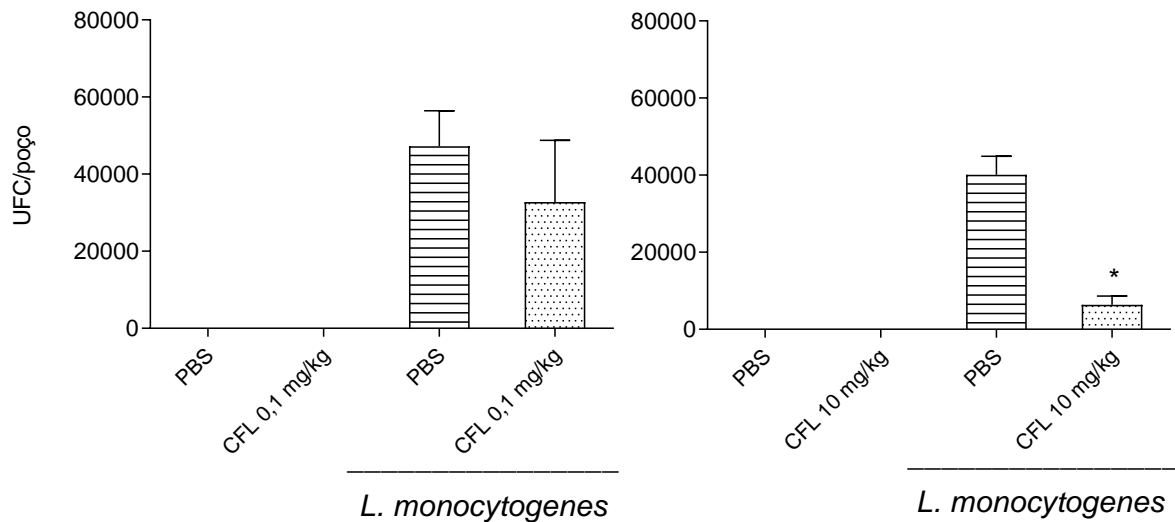
\* indica diferença significativa em relação ao grupo controle infectado não tratado, com  $p < 0,05$  de acordo com o teste ANOVA seguido pelo pós-teste de Bonferroni.

**FIGURA 3.** Quantificação de bactérias no fluido peritoneal e sangue de camundongos tratados com CFL e infectados com *Listeria monocytogenes*.



\* indica diferença significativa em relação ao grupo controle infectado não tratado, com  $p < 0,05$  de acordo com o teste ANOVA seguido pelo pós-teste de Bonferroni.

**FIGURA 4.** Quantificação bacteriana intracelular em macrófagos peritoneais obtidos de animais tratados com CFL e infectados com *Listeria monocytogenes*.



\* indica diferença significativa em relação ao grupo controle infectado não tratado, com  $p < 0,05$  de acordo com o teste ANOVA seguido pelo pós-teste de Bonferroni.

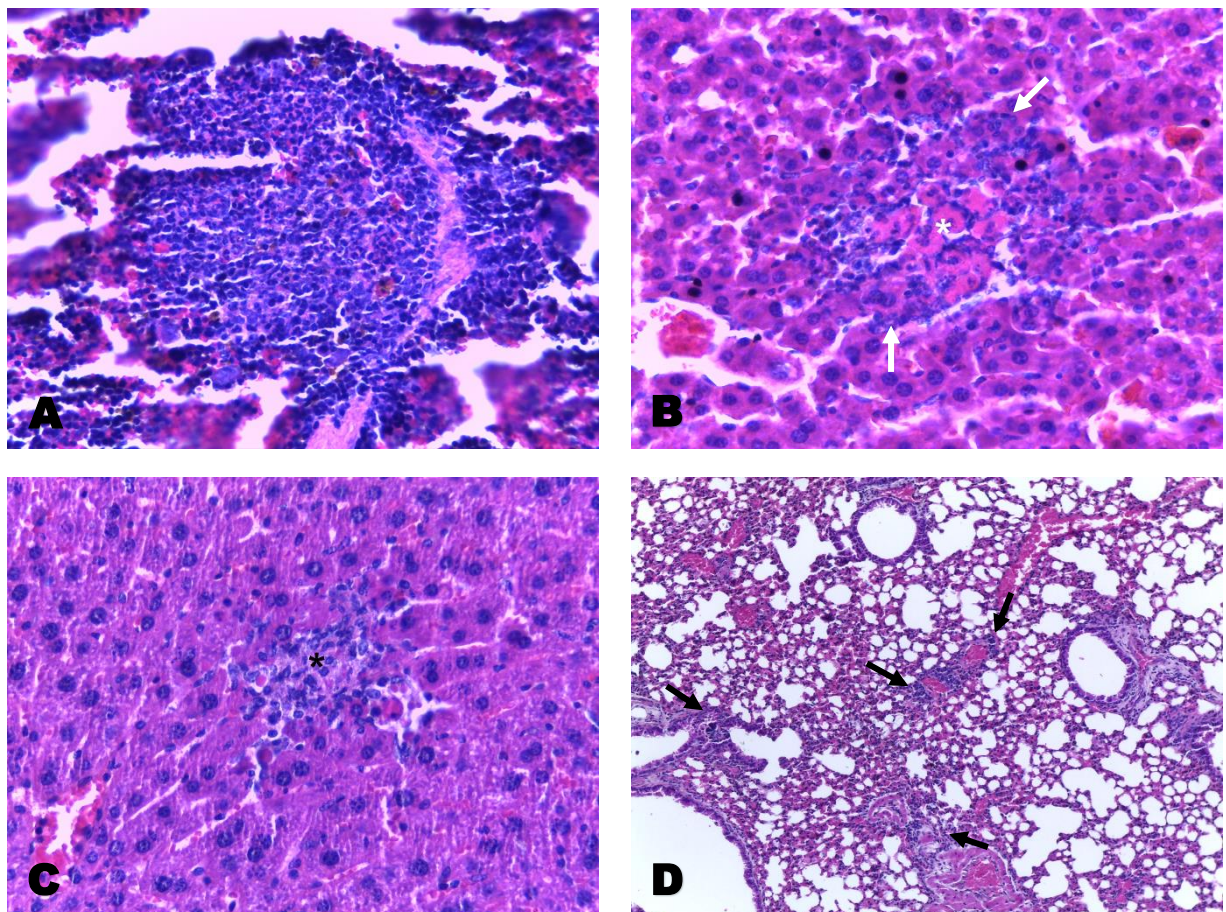
A contagem de leucócitos totais no esfregaço de sangue periférico dos animais não revelou diferenças significativas no número de células entre os grupos avaliados.

De forma semelhante, a contagem de leucócitos do fluido peritoneal dos animais não mostrou alteração no número de células total ou diferencial (neutrófilos, linfócitos, monócitos e eosinófilos) dos animais expostos à infecção por *L. monocytogenes* ou tratados com a lectina CFL em ambas as concentrações, quando comparados ao controle não infectado e não tratado (Tabela 1).

Considerando que a lectina CFL a 10 mg/kg teve uma maior capacidade de promover a depuração bacteriana em tecidos e no interior de macrófagos, apenas os órgãos dos animais tratados com a lectina na maior concentração foram submetidos a análises histopatológicas. A análise dos baços dos animais revelou hiperplasia da polpa branca com severidade leve em um animal do grupo infectado sem tratamento. Nesse mesmo grupo, dois animais apresentaram abscesso focal leve (Figura 5a). Já no grupo infectado tratado, observou-se hiperplasia de polpa branca leve em dois animais. Hematopoiese extramedular leve foi observada em animais de todos os

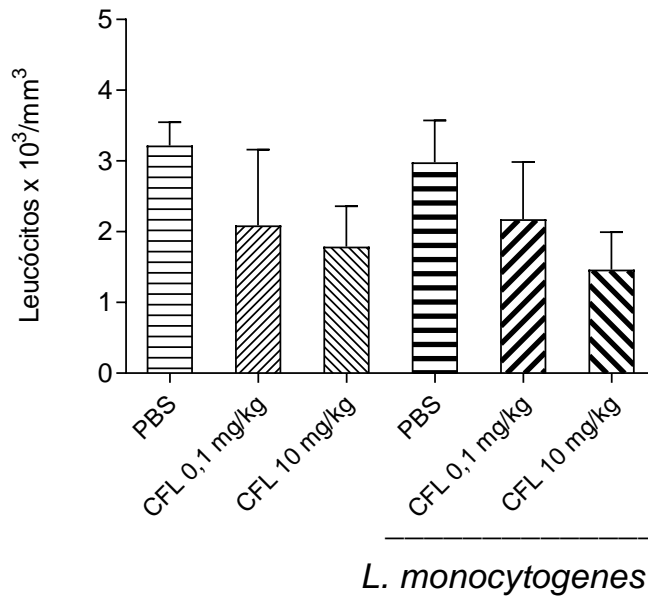
grupos. Nos grupos não infectados, não se observou outras alterações histológicas. No fígado, observou-se microabscessos, degeneração e necrose leves a moderadas de hepatócitos em animais de todos os grupos (Figura 5b). Além disso, observou-se agregados mononucleares em um animal do grupo que recebeu apenas tratamento e em um animal do grupo infectado tratado (Figura 5c). A análise histopatológica dos pulmões mostrou que doze animais, distribuídos em todos os grupos, apresentavam pneumonia broncointersticial linfoplasmocitária, e seis tiveram hemorragia alveolar focal leves (Figura 5d). Também se observou agregados linfoides nos pulmões de dois animais do grupo infectado que recebeu tratamento com a lectina CFL.

**FIGURA 5.** Histopatologia dos animais tratados com CFL e infectados com *Listeria monocytogenes*.



Cortes histológicos de baço, fígado e pulmão de camundongos infectados com *L. monocytogenes* e tratados com lectina CFL (10 mg/kg). **A.** Abscesso focal em baço - HE, objetiva 40x. **B.** Microabscesso (asterisco) e necrose de hepatócitos multifocal (setas) - HE, obj. 40x. **C.** Agregado mononuclear - HE, obj. 40x. **D.** Pneumonia broncointersticial linfoplasmocitária - HE, obj. 10x.

**FIGURA 6.** Contagem total de leucócitos no sangue dos animais tratados com CFL e infectados com *Listeria monocytogenes*.



Os dados representam a média de quatro medições e a comparação dos dados foi por análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Bonferroni.

**TABELA 1.** Contagem total e diferencial de leucócitos no fluido peritoneal dos animais tratados com CFL e infectados com *Listeria monocytogenes*.

Grupos	Total de leucócitos (10 <sup>3</sup> células/mm <sup>3</sup> )	Contagem diferencial de leucócitos (10 <sup>3</sup> células/mm <sup>3</sup> ) no fluido peritoneal			
		Neutrófilos	Linfócitos	Monócitos	Eosinófilos
PBS	1,0 ± 0,19	0,15 ± 0,02	1,0 ± 0,11	0,07 ± 0,01	0,04 ± 0,01
CFL 0,1	0,81 ± 0,34	0,10 ± 0,02	0,97 ± 0,27	0,01 ± 0,01	0,0 ± 0,0
CFL 10	0,81 ± 0,13	0,08 ± 0,02	1,03 ± 0,52	0,64 ± 0,47	0,05 ± 0,04
<i>Listeria</i>	1,28 ± 0,17	0,17 ± 0,05	1,51 ± 0,38	0,18 ± 0,08	0,02 ± 0,01
<i>List</i> +CFL 0,1	1,54 ± 0,24	0,16 ± 0,04	1,3 ± 0,18	0,08 ± 0,03	0,01 ± 0,01
<i>List</i> +CFL 10	1,04 ± 0,26	0,23 ± 0,11	1,06 ± 0,34	0,15 ± 0,08	0,02 ± 0,01

Os resultados foram expressos como a média ± erro padrão médio de células x 10<sup>3</sup> células/mm<sup>3</sup> de fluido e a comparação dos dados foi por análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Bonferroni.

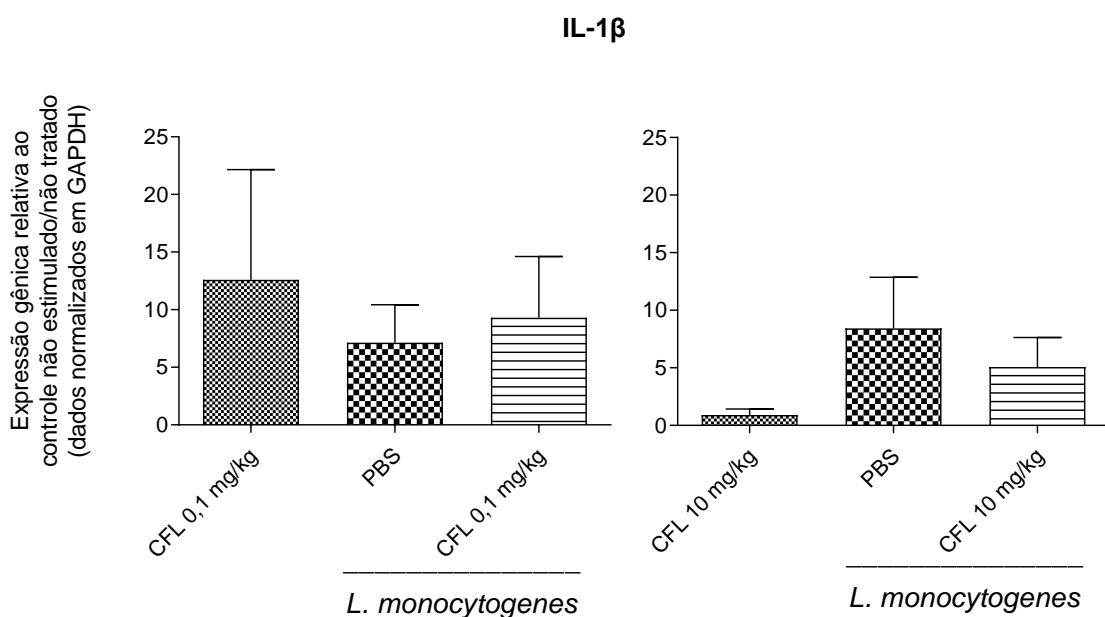


A análise de expressão de citocinas mostrou que não houve aumento significativo na expressão de IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10 e TNF- $\alpha$  no baço dos animais submetidos a infecção por *L. monocytogenes* e/ou tratados com a lectina CFL em ambas as concentrações, quando comparados ao grupo sem infecção e sem tratamento (Figura 7).

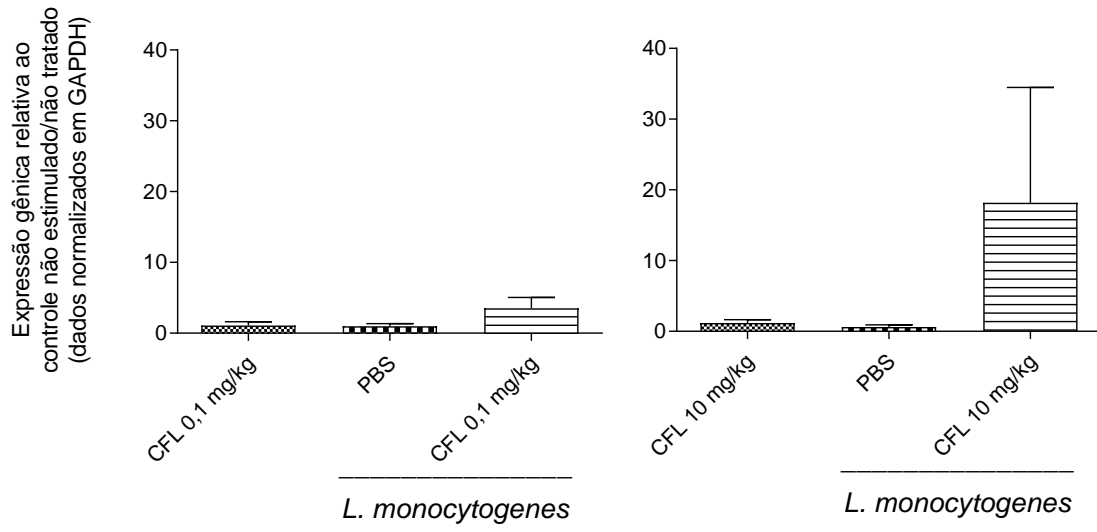
Em contrapartida, observou-se que animais infectados por *L. monocytogenes* tiveram um aumento significativo ( $p < 0,05$ ) na expressão de iNOS no baço quando os animais infectados foram tratados com a lectina na concentração de 10 mg/kg (Figura 8). No entanto, quando administrada sem a presença da bactéria, a lectina CFL a 10 mg/kg não foi capaz de provocar aumento na expressão de iNOS. Na concentração de 0,1 mg/kg, a lectina não provocou alterações na expressão de iNOS nos animais infectados e não infectados.

No teste *in vitro*, após análises de crescimento bacteriano e absorvância das culturas bacterianas, verificou-se que a lectina, em todas as concentrações testadas, não apresentou atividade antimicrobiana (dados não mostrados).

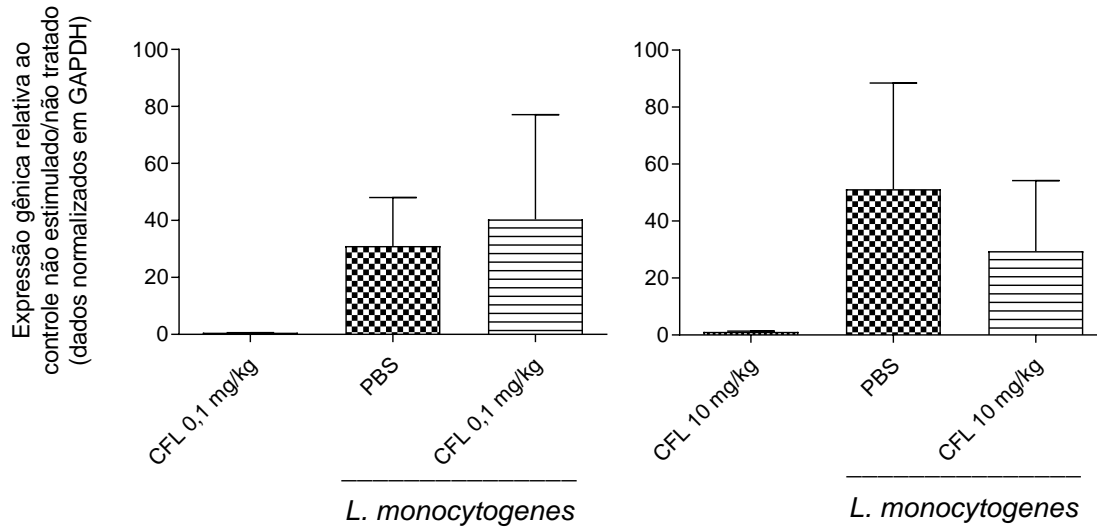
**FIGURA 7.** Expressão gênica das citocinas inflamatórias em animais tratados com CFL e infectados com *Listeria monocytogenes*.

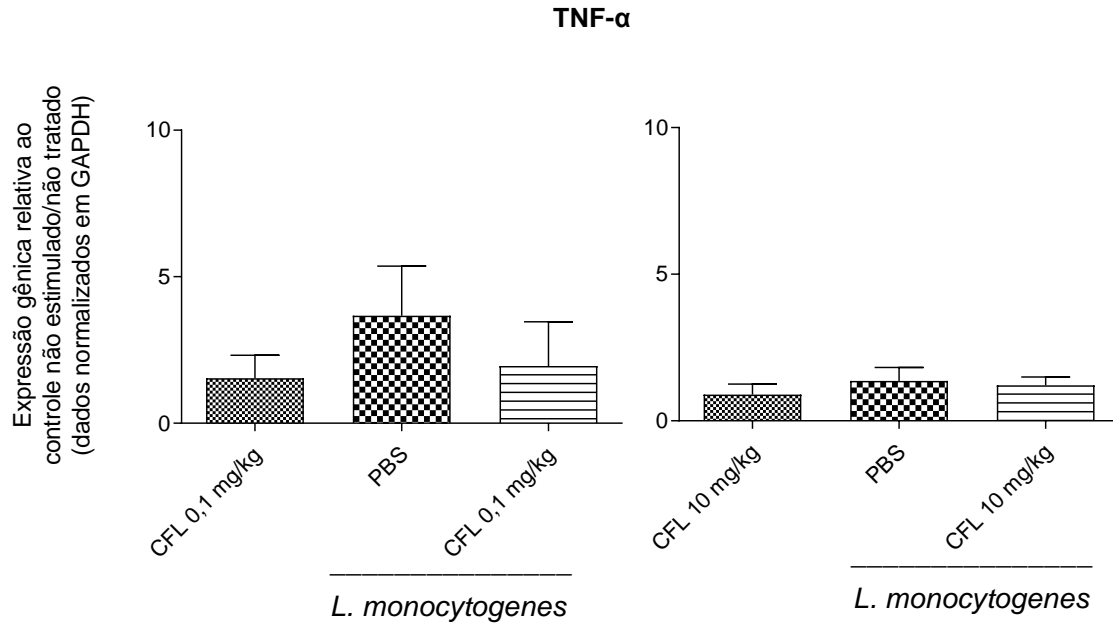


## IL-6



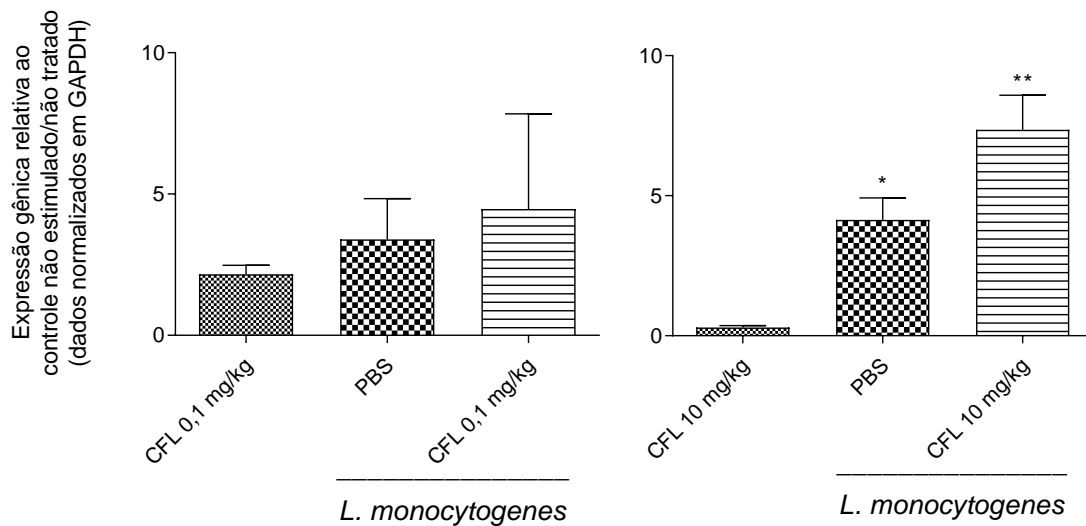
## IL-10





Os dados representam a média de quatro medições e a comparação dos dados foi por análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Bonferroni.

**FIGURA 8.** Expressão gênica da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) no baço de animais tratados com CFL e infectados com *Listeria monocytogenes*.



\* indica diferença significativa em relação ao grupo não infectado e \*\* indica diferença significativa em relação ao grupo infectado não tratado, com  $p < 0,05$  de acordo com o teste ANOVA seguido pelo pós-teste de Bonferroni.

## 6. DISCUSSÃO

*L. monocytogenes* causa esplenomegalia, hepatomegalia e aumento no peso do pulmão rapidamente após o início da infecção. Tal aumento é característico de infecções bacterianas intracelulares devido a infiltração leucocitária e processo inflamatório decorrente nos órgãos alvo (COCO; LEANZA, 2019; SENOSIAÍN; IBÁÑEZ, 2012). Como consequência, *L. monocytogenes* também causa abscessos em diferentes órgãos viscerais (VÁZQUEZ-BOLAND et al., 2001). O fígado é um dos primeiros órgãos alvos da bactéria, sendo o baço e pulmão sítios onde *L. monocytogenes* também é capaz de se proliferar (RAMASWAMY et al., 2007). Assim, o aumento do peso médio desses órgãos no início da infecção já era esperado. Contudo, foi observado que a administração endovenosa da lectina CFL na concentração de 10 mg/kg foi capaz de prevenir o aumento do baço e pulmão dos animais infectados, enquanto a 0,1 mg/kg a lectina foi capaz de prevenir o aumento do peso médio do fígado. Tais resultados sugeriram que a administração da lectina CFL pode ter influenciado a progressão da infecção por *L. monocytogenes*.

A quantificação de bactérias revelou diminuição da carga bacteriana no baço, fígado e sangue, locais que concentram grande carga bacteriana durante infecção por *L. monocytogenes*, nos animais tratados com a lectina CFL a 10 mg/kg. Esses dados corroboram com a hipótese de que a lectina foi capaz de diminuir ou retardar a infecção por *L. monocytogenes*. Estudos demonstraram que macrófagos residentes do baço e fígado são responsáveis por capturar boa parte da carga bacteriana circulante no sangue (CONLAN; NORTH, 1991; COUSENS; WING, 2000). Considerando que a lectina CFL poderia estar influenciando na ativação e/ou no aumento da capacidade fagocítica dos macrófagos e neutrófilos dos órgãos infectados, a carga microbiana intracelular de macrófagos peritoneais de animais infectados e tratados com CFL foi quantificada. Após infecção por *L. monocytogenes*, macrófagos rapidamente se encarregam de fagocitar os organismos invasores, sendo os principais responsáveis por eliminar a carga bacteriana nas primeiras horas de infecção, entretanto, essas células não conseguem eliminar a totalidade dos microorganismos, permitindo a disseminação da infecção (EBE et al., 1999; VÁZQUEZ-BOLAND et al., 2001). Nossos resultados mostraram que animais tratados com CFL a 10 mg/kg tiveram maior sucesso na depuração bacteriana intracelular, quando

comparados a macrófagos de animais não tratados. Esse resultado é corroborado por Batista et al. (2017), que demonstram que macrófagos estimulados *in vitro* com CFL (10 µg/mL) aumentam a eliminação intracelular de *Salmonella enterica* (BATISTA et al., 2017), reforçando a hipótese de que a lectina CFL é capaz de modular uma resposta imune anti-infecciosa, estimulando a capacidade bactericida intracelular dos macrófagos.

Apesar de diversos estudos já terem descrito as atividades biológicas desencadeadas pela lectina CFL e sua capacidade de modular processos inflamatórios (ASSREUY et al., 1997; BARRAL-NETO et al., 1992; FAHEINA-MARTINS et al., 2011; HAVT et al., 2015), seu potencial imunoterapêutico no controle de infecções por micro-organismos ainda não foi muito explorado. Anteriormente, um dos únicos estudos envolvendo a influência da lectina CFL em infecção bacteriana *in vivo*, onde ela foi administrada previamente à infecção por *Salmonella enterica* na concentração de 10 mg/kg, observou-se uma diminuição na carga bacteriana no baço, fígado, fluido peritoneal e sangue de camundongos após três dias de infecção (SILVA et al., 2016). Esses autores também demonstraram que o tratamento com a lectina CFL, via intraperitoneal, induziu o recrutamento de leucócitos em camundongos não infectados. Quando os animais previamente tratados foram infectados por *Salmonella*, houve um aumento no número de leucócitos três dias após infecção, superior ao de animais infectados, mas não tratados com CFL.

No presente trabalho não se observou influência da lectina na contagem de leucócitos e linfócitos em animais saudáveis, possivelmente devido à diferença na via de administração, o que sugere que a lectina CFL possui um maior efeito imunomodulatório quando administrada via intraperitoneal do que por via endovenosa. Entretanto, Assreuy et al. (1997) demonstraram que camundongos tratados com CFL, via endovenosa, tiveram uma inibição da migração de neutrófilos induzida pela administração intraperitoneal de carragenina; e a administração prévia de CFL a 10 mg/kg diminuiu 73% a migração de neutrófilos causadas por fMLP (fator quimiotático de leucócitos polimorfonucleares e ativador de macrófagos) 4 horas após estímulo inflamatório (ASSREUY et al., 1997), mostrando que, mesmo em via endovenosa, a lectina possui atividade anti-inflamatória.

Diversos estudos já demonstraram que a via de administração das lectinas vegetais pode influenciar o tipo de respostas que elas vão desencadear, sejam elas pró- ou anti-inflamatórias, ativando ou inibindo a migração de neutrófilos (ALENCAR et al., 2005a, 1999, 2003, 2005b). O modo como as lectinas são absorvidas pelo organismo também influencia em suas atividades (BARRAL-NETTO et al., 1996), sendo assim, a via de administração das proteínas é crucial para determinar o tipo de atividade biológica que ela desencadeará. Sabe-se que a lectina de *Cratylia argentea*, por exemplo, mantém sua conformação ao ser submetida às enzimas do trato digestivo, garantindo suas atividades biológicas mesmo sob processamento proteolítico (OLIVEIRA et al., 2004; RAMOS et al., 1999).

Experimentos com ratos-do-deserto mostraram que após 7 dias de infecção por *L. monocytogenes*, há uma queda acentuada no número de linfócitos e de leucócitos totais do sangue dos animais (JAGUEZESKI et al., 2020). No presente estudo, não houve alteração no número dessas células nos animais infectados, comparados aos animais não infectados, o que provavelmente se deve ao tempo curto de infecção. Também não se observou aumento no número de células tipicamente recrutadas na presença de infecções bacterianas, como os neutrófilos e monócitos, recrutados para o foco de infecção nos primeiros estágios da invasão (GREGORY; SAGNIMENI; WING, 1996).

A ocorrência de hematopoiese extramedular é comum na polpa vermelha do baço de camundongos, sendo consequência da produção de células hematopoiéticas em animais jovens (BARBIERI et al., 2017), mas podendo estar relacionada a perda de sangue, lesões, neoplasia ou inflamações (SCUDAMORE, 2014). Como todos os animais apresentaram esse quadro, com severidade leve, incluindo os saudáveis, pode-se inferir que a ocorrência de hematopoiese extramedular, nesse caso, é secundária. Também observou-se hiperplasia da polpa branca em três animais. Tal aumento do tecido linfoide é um processo natural devido ao envelhecimento dos animais, mais frequente em camundongos fêmeas (BRADLEY; MUKARATIRWA; PETERSEN-JONES, 2012; SCUDAMORE, 2014). Por outro lado, abscessos focais foram encontrados nos baços de camundongos infectados, provavelmente decorrentes da infecção por *L. monocytogenes*. Em contrapartida, os animais infectados tratados com a lectina CFL a 10 mg/kg não apresentaram abscessos,

sendo mais um indicativo de que a lectina nessa concentração é capaz de inibir a infecção por *L. monocytogenes*.

A análise histopatológica dos órgãos não mostrou alterações histológicas relacionadas à infecção por *L. monocytogenes* ou ao tratamento com a lectina CFL. Tal resultado pode ser explicado pelo tempo curto de infecção. Em estudo recente, foram observadas poucas alterações patológicas em baço de camundongos infectados por *L. monocytogenes*, 18 horas após a infecção (Robledo-Avila et al., 2020). Também já foi demonstrado que, após três dias de infecção por *L. monocytogenes*, a polpa branca do baço de camundongos ainda não apresenta danos, enquanto poucos focos apoptóticos são encontrados nos hepatócitos (Vega-Ramos et al., 2010). Um outro estudo, com inoculação de *L. monocytogenes* via gástrica, demonstrou que respostas inflamatórias nos tecidos de fígado e baço só são observadas a partir de 3 dias pós infecção (Park et al., 2004).

Para investigar se o efeito de CFL poderia estar associado a ativação de mediadores inflamatórios, a expressão gênica de citocinas importantes na resposta inata foi avaliada.

Não houve diferença significativa na expressão gênica das citocinas TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-10 nos animais estimulados com a bactéria e tratados com a lectina nas duas concentrações, comparados ao grupo controle. É importante observar que TNF- $\alpha$  é uma citocina produzida naturalmente por macrófagos teciduais em resposta a infecção (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015; LIU; KURLANDER, 1995), entretanto, não houve um aumento da expressão gênica dessa citocina nos animais infectados, o que pode indicar a presença de fatores inibidores de TNF no processo infeccioso de *L. monocytogenes*. Sabe-se que a produção de TNF na resposta imune inata é essencial no combate à infecção por *L. monocytogenes* (BUCHMEIER; SCHREIBER, 1985; OKUNNU; BERG, 2019; PASPARAKIS et al., 1996). Pamer et al. demonstraram que camundongos incapazes de produzir essa citocina ou seus receptores não conseguem combater a infecção por *L. monocytogenes* (PAMER, 2004). De modo semelhante, a inativação do gene TNF- $\alpha$  em neutrófilos, monócitos e macrófagos aumenta a vulnerabilidade de camundongos frente à bactéria causadora da listeriose (GRIVENNIKOV et al., 2005).

Uma das estratégias de *L. monocytogenes* de sobreviver a resposta imunológica do hospedeiro é estimular a produção de IL-10, uma citocina anti-inflamatória capaz de diminuir a ativação e capacidade bactericida de macrófagos e inibir diferentes citocinas inflamatórias. Em estudo *in vivo*, camundongos com a produção de IL-10 inibida se tornaram mais resistentes contra infecção por *L. monocytogenes* (CLARK et al., 2016; FOULDS; ROTTE; SEDER, 2006). Contudo, não observamos diferença significativa na expressão gênica de IL-10 entre os grupos de animais, provavelmente devido ao tempo curto de infecção. Macrófagos infectados também produzem as interleucinas IL-12, IL-15 e IL-18, responsáveis pelo recrutamento e ativação das células NK, que, por sua vez irão produzir Interferon-gama (IFN- $\gamma$ ) (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015). Essa citocina irá auxiliar no controle da infecção ao participar da ativação e maturação de monócitos em macrófagos e células dendríticas, estimulando também a síntese de iNOS, enzima responsável pela produção de óxido nítrico (NO), que elimina bactérias no ambiente intracelular (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015; SERBINA et al., 2003). Sabe-se que a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e de nitrogênio são os métodos mais eficazes de eliminar *L. monocytogenes* no ambiente intracelular (SHILOH et al., 1999).

Apesar de *L. monocytogenes* ser capaz de inibir o efeito de IFN- $\gamma$  na ativação de monócitos, diminuindo, por consequência, a produção de TNF- $\alpha$  e iNOS (WOODWARD; LAVARONE; PORTNOY, 2010), observamos que o tratamento com a lectina CFL a 10 mg/kg foi capaz de aumentar a expressão de iNOS em camundongos infectados por *L. monocytogenes*. Tal resultado sugere que CFL estimulou a expressão gênica da enzima de forma independente das citocinas clássicas pró-inflamatórias IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$ , o que explica a maior depuração bacteriana intracelular nos macrófagos infectados nos animais tratados. Tal eliminação não pode ser explicada por ação antimicrobiana direta de CFL contra as células de *L. monocytogenes*, uma vez que a bactéria cresce *in vitro* normalmente na presença de diferentes concentrações da lectina. Tal observação corrobora dados anteriores de Batista et al., (2017) obtidos no estudo de CFL contra *Salmonella*.



## 7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Tomados juntos, os resultados obtidos nesse estudo indicam que a lectina CFL possui potencial como adjuvante terapêutico contra infecções bacterianas intracelulares causadas por *L. monocytogenes*. Apesar dos mecanismos que explicam sua ação anti-infecciosa não estarem completamente esclarecidos, ficou claro que: a) os tratamentos endovenosos com CFL não provocaram toxicidade aguda aos animais; b) os tratamentos diminuíram a carga microbiana em órgãos alvo da infecção; c) a eliminação das bactérias parece estar relacionada a ativação da capacidade bactericida de macrófagos via aumento da produção de óxido nítrico em animais tratados com CFL. Considerando sua capacidade de modular a resposta inflamatória contra *L. monocytogenes* e *Salmonella*, novos estudos acerca de dosagens, tempo de tratamento e via de administração serão necessários para o desenvolvimento de uma formulação terapêutica para uso clínico associado a antibióticos no combate a infecções por micro-organismos, em especial *L. monocytogenes*.

## 8. REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. *Imunologia Celular e Molecular - Abbas 8ed-2. Elsevier Editora Ltda*, n. 8, p. 631–667, 2015.
- AFONSO-CARDOSO, S. R. et al. Effect of the *Synadenium carinatum* latex lectin (ScLL) on *Leishmania (Leishmania) amazonensis* infection in murine macrophages. **Experimental Parasitology**, v. 128, n. 1, p. 61–67, 2011.
- ALENCAR, N. et al. *Vatairea Macrocarpa* Lectin Induces Paw Edema With Leukocyte Infiltration. **Protein & Peptide Letters**, v. 11, n. 2, p. 195–200, 2005a.
- ALENCAR, N. M. N. et al. Leguminous lectins as tools for studying the role of sugar residues in leukocyte recruitment. **Mediators of Inflammation**, v. 8, n. 2, p. 107–113, 1999.
- ALENCAR, N. M. N. et al. The galactose-binding lectin from *Vatairea macrocarpa* seeds induces in vivo neutrophil migration by indirect mechanism. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 35, n. 12, p. 1674–81, 2003.
- ALENCAR, V. B. M. et al. Pro-inflammatory effect of *Arum maculatum* lectin and role of resident cells. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 37, n. 9, p. 1805–1814, 2005b.
- ALLAM, B.; RAFTOS, D. Immune responses to infectious diseases in bivalves. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 131, n. May, p. 121–136, 2015.
- ARAÚJO-JORGE, T. C. DE; CASTRO, S. L. DE. **Doença de chagas: manual para experimentação animal**. 1. ed. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 2000.
- ASSREUY, A. M. S. et al. Anti-inflammatory effect of glucose—mannose binding lectins isolated from Brazilian beans. **Mediators of Inflammation**, v. 6, n. 3, p. 201–210, 1997.
- BAKOWSKY, H. et al. Adhesion characteristics and stability assessment of lectin-modified liposomes for site-specific drug delivery. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, v. 1778, n. 1, p. 242–249, 2008.
- BARBIERI, R. L. et al. Stem cells hematopoietic niches and inflammatory response to different synthetic prosthesis implanted in rat with incisional hernias. **Arquivos Brasileiros De Cirurgia Digestiva**, v. 30, n. 2, p. 108–113, 2017.
- BARBUDDHE, S. B. et al. Epidemiology and risk management of listeriosis in India. **International Journal of Food Microbiology**, v. 154, n. 3, p. 113–118, 2012.
- BARRAL-NETO, M. et al. Human lymphocyte stimulation by legume lectins from the diocleae tribe. **Immunological Investigations**, v. 21, n. 4, p. 297–303, 1992.
- BARRAL-NETTO, M. et al. In vivo protective effect of the lectin from *Canavalia brasiliensis* on BALB/c mice infected by *Leishmania amazonensis*. **Acta tropica**, v. 60, n. 4, p. 237–50, 1996.
- BASHA, K. A. et al. Prevalence, molecular characterization, genetic heterogeneity and antimicrobial resistance of *Listeria monocytogenes* associated with fish and fishery environment in Kerala, India. **Letters in Applied Microbiology**, v. 69, n. 4, p. 286–293, 2019.

- BATISTA, J. E. C. et al. Plant lectins ConBr and CFL modulate expression toll-like receptors, pro-inflammatory cytokines and reduce the bacterial burden in macrophages infected with *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. **Phytomedicine**, v. 25, p. 52–60, 2017.
- BRADLEY, A.; MUKARATIRWA, S.; PETERSEN-JONES, M. Incidences and Range of Spontaneous Findings in the Lymphoid and Haemopoietic System of Control Charles River CD-1 Mice (CrI: CD-1(ICR) BR) Used in Chronic Toxicity Studies. **Toxicologic Pathology**, v. 40, n. 2, p. 375–381, 2012.
- BUCHMEIER, N. A.; SCHREIBER, R. D. Requirement of endogenous interferon- $\gamma$  production for resolution of *Listeria monocytogenes* infection. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 82, n. 21, p. 7404–7408, 1985.
- BUNDRANT, B. N. et al. Listeriosis Outbreak in Dairy Cattle Caused by an Unusual *Listeria Monocytogenes* Serotype 4b Strain. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 23, n. 1, p. 155–158, 2011.
- CALVETE, J. J. et al. Molecular characterization and crystallization of Diocleinae lectins. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1430, p. 367–375, 1999.
- CAVADA, B. et al. Revisiting proteus: Do Minor Changes in Lectin Structure Matter in Biological Activity? Lessons from and Potential Biotechnological Uses of the Diocleinae Subtribe Lectins. **Current Protein & Peptide Science**, v. 2, n. 2, p. 123–135, 2001.
- CLARK, S. E. et al. Bacterial Manipulation of NK Cell Regulatory Activity Increases Susceptibility to *Listeria monocytogenes* Infection. **PLOS Pathogens**, v. 12, n. 6, p. e1005708, 2016.
- COBO, J. G. et al. Decomposition and nutrient release by green manures in a tropical hillside agroecosystem. **Plant and Soil**, v. 240, n. 2, p. 331–342, 2002.
- COCO, D.; LEANZA, S. Indications for surgery in non-traumatic spleen disease. **Open Access Macedonian Journal of Medical Sciences**, v. 7, n. 17, p. 2958–2960, 2019.
- CONLAN, J. W.; NORTH, R. J. Neutrophil-mediated dissolution of infected host cells as a defense strategy against a facultative intracellular bacterium. **Journal of Experimental Medicine**, v. 174, n. 3, p. 741–744, 1991.
- COUSENS, L. P.; WING, E. J. Innate defenses in the liver during *Listeria* infection. **Immunological Reviews**, v. 174, n. 1, p. 150–159, 2000.
- DA SILVA, M. E. et al. Anthelmintic efficacy of *Cratylia argentea* (Desv.) Kuntze against the gastrointestinal nematodes of sheep. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 38, n. 5, p. 3105–3112, 2017.
- DE OLIVEIRA FIGUEIROA, E. et al. Lectin-Carbohydrate Interactions: Implications for the Development of New Anticancer Agents. **Current Medicinal Chemistry**, v. 24, n. 34, 2017.
- DE QUEIROZ, L. P. et al. A multilocus phylogenetic analysis reveals the monophyly of a circumscribed papilionoid legume tribe Diocleae with well-supported generic relationships. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 90, p. 1–19, 2015.
- DE SOUZA CÂNDIDO, E. et al. Plant storage proteins with antimicrobial activity: Novel insights into plant defense mechanisms. **FASEB Journal**, v. 25, n. 10, p. 3290–3305,

2011.

DE SOUZA FEITOSA LIMA, I. M. et al. Schinus terebinthifolia leaf lectin (SteLL) has anti-infective action and modulates the response of Staphylococcus aureus-infected macrophages. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, 2019.

DUSSAULT, A. A.; POULIOT, M. Rapid and simple comparison of messenger RNA levels using real-time PCR. **Biological Procedures Online**, v. 8, n. 1, p. 1–10, 2006.

EBE, Y. et al. The role of Kupffer cells and regulation of neutrophil migration into the liver by macrophage inflammatory protein-2 in primary listeriosis in mice. **Pathology International**, v. 49, n. 6, p. 519–532, 1999.

EFSA; ECDC. The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2012. **European Food Safety Authority Journal**, v. 12, n. 2, p. 312, 2016.

FAHEINA-MARTINS, G. V. et al. Influence of fetal bovine serum on cytotoxic and genotoxic effects of lectins in MCF-7 cells. **Journal of Biochemical and Molecular Toxicology**, v. 25, n. 5, p. 290–296, 2011.

FARBER, J. M.; PETERKIN, P. I. Listeria monocytogenes, a food-borne pathogen. **Microbiological reviews**, v. 55, n. 3, p. 476–511, 1991.

FOULDS, K. E.; ROTTE, M. J.; SEDER, R. A. IL-10 Is Required for Optimal CD8 T Cell Memory following Listeria monocytogenes Infection. **The Journal of Immunology**, v. 177, n. 4, p. 2565–2574, 2006.

FRACASSO, J. . Contribuição ao entendimento da patogenia da sepse. **Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.**, v. 29, n. 2, p. 119–127, 2008.

FREITAG, N. E.; PORT, G. C.; MINER, M. D. Listeria monocytogenes — from saprophyte to intracellular pathogen. **Nature Reviews Microbiology**, v. 7, n. 9, p. 623–628, 2009.

FURA, J. et al. Combatting Bacterial Pathogens with Immunomodulation and Infection Tolerance Strategies. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 17, n. 3, p. 290–304, 2016.

GAUTO, A. R. et al. Arterial infections due to Listeria monocytogenes: report of four cases and review of the world literature. **Clinical Infectious Diseases**, v. 14, p. 23–28, 1992.

GOLDMAN, R.; SHARON, N.; LOTAN, R. A differential response elicited in macrophages on interaction with lectins. **Experimental Cell Research**, v. 99, p. 408–422, 1976.

GOLDSTEIN, I. J.; HUGHES, R. C.; AL., E. Goldstein, I.J., Hughes, R.C., Monsigny, M., et al., 1980. What should be called a lectin? *Nature* 285, 66. **Nature**, v. 285, p. 66, 1980.

GOMES, J. C. et al. Histamine release induced by glucose (mannose)-specific lectins isolated from Brazilian beans. Comparison with concanavalin A. **Agents and actions**, v. 41, n. 3–4, p. 132–5, 1994.

GÓMEZ, D. et al. Antimicrobial resistance of Listeria monocytogenes and Listeria innocua from meat products and meat-processing environment. **Food Microbiology**, v. 42, p. 61–65, 2014.

- GRIVENNIKOV, S. I. et al. Distinct and nonredundant in vivo functions of TNF produced by T cells and macrophages/neutrophils: Protective and deleterious effects. **Immunity**, v. 22, n. 1, p. 93–104, 2005.
- HAVT, A. et al. The effect of Cratylia floribunda lectin on renal hemodynamics and ion transport. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 51, n. 3, p. 755–761, 2015.
- HO, J. L. et al. An outbreak of type 4b Listeria monocytogenes infection involving patients from eight Boston hospitals. **Archives of internal medicine**, v. 146, n. 3, p. 520–4, 1986.
- JAGUEZESKI, A. M. et al. Experimental listeriosis: a study of purinergic and cholinergic inflammatory pathway. **Veterinary Microbiology**, v. 241, 2020.
- JAMSHIDI, A.; ZEINALI, T. Significance and Characteristics of Listeria monocytogenes in Poultry Products. **International Journal of Food Science**, v. 2019, 2019.
- JANDÚ, J. J. et al. Treatment with pCramoll alone and in combination with fluconazole provides therapeutic benefits in C. gattii infected mice. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 7, n. MAY, 2017.
- KANG, S.-J. et al. Regulation of hierarchical clustering and activation of innate immune cells by dendritic cells. **Immunity**, v. 29, n. 5, p. 819–833, 2008.
- KHAN, F. et al. Lectins as markers for blood grouping. **Medical science monitor : international medical journal of experimental and clinical research**, v. 8, n. 12, p. 293-A300, 2002.
- LAM, S. K.; NG, T. B. Lectins: Production and practical applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 89, n. 1, p. 45–55, 2011.
- LECUIT, M. et al. Internalin of Listeria monocytogenes with an intact leucine-rich repeat region is sufficient to promote internalization. **Infection and Immunity**, v. 65, n. 12, p. 5309–5319, 1997.
- LECUIT, M. Human listeriosis and animal models. **Microbes and Infection**, v. 9, n. 10, p. 1216–1225, 2007.
- LEE, S.; NALINI, M.; KIM, Y. A viral lectin encoded in Cotesia plutellae bracovirus and its immunosuppressive effect on host hemocytes. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 149, n. 4, p. 351–361, 2008.
- LIAO, W. R. et al. Antibiotic activity of lectins from marine algae against marine vibrios. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 30, n. 7, p. 433–439, 2003.
- LIU, L.; DANG, Y. Antimicrobial activity of mannose binding lectin in grass carp (Ctenopharyngodon idella) in vivo and in vitro. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 98, p. 25–33, 2020.
- LIU, W.; KURLANDER, R. J. Analysis of the interrelationship between IL-12, TNF- $\alpha$ , and IFN- $\gamma$  production during murine listeriosis. **Cellular Immunology**, v. 163, n. 2, p. 260–267, 1995.
- LIU, X.; MENG, J. Luteolin alleviates LPS-induced bronchopneumonia injury in vitro and in vivo by down-regulating microRNA-132 expression. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 106, p. 1641–1649, 2018.

- LORBER, B. Listeriosis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 24, n. 1, p. 1–11, 1997.
- LOW, J. C.; DONACHIE, W. A review of *Listeria monocytogenes* and listeriosis. **Veterinary journal (London, England : 1997)**, v. 153, n. 1, p. 9–29, 1997.
- MACHESKY, L. M. Cell motility: complex dynamics at the leading edge. **Current biology : CB**, v. 7, n. 3, p. R164-7, 1997.
- MACKANESS, G. B. CELLULAR RESISTANCE TO INFECTION. **Journal of Experimental Medicine**, v. 116, n. 3, p. 381–406, 1962.
- MACKANESS, G. B. THE INFLUENCE OF IMMUNOLOGICALLY COMMITTED LYMPHOID CELLS ON MACROPHAGE ACTIVITY IN VIVO. **Journal of Experimental Medicine**, v. 129, n. 5, p. 973–992, 1969.
- MARQUIS, H. et al. Pathogenesis of *Listeria monocytogenes* in humans. In: SINGH, S. K. (Ed.). . **Human emerging and re-emerging infections: bacterial & mycotic infections**. 1. ed. New Jersey: JOHN WILEY & SONS, 2016. v. 2p. 749–772.
- MATEUS, T. et al. Listeriosis during Pregnancy: A Public Health Concern. **ISRN Obstetrics and Gynecology**, v. 2013, p. 1–6, 2013.
- MAURY, M. M. et al. Uncovering *Listeria monocytogenes* hypervirulence by harnessing its biodiversity. **Nature Genetics**, v. 48, n. 3, p. 308–313, 2016.
- MCINTYRE, L.; WILCOTT, L.; NAUS, M. Listeriosis Outbreaks in British Columbia, Canada, Caused by Soft Ripened Cheese Contaminated from Environmental Sources. **BioMed Research International**, v. 2015, p. 1–12, 2015.
- MCLAUCHLIN, J. Human listeriosis in Britain, 1967-85, a summary of 722 cases. 1. Listeriosis during pregnancy and in the newborn. **Epidemiology and Infection**, v. 104, n. 2, p. 181–9, 1990.
- MEDZHITOV, R. Recognition of microorganisms and activation of the immune response. **Nature**, v. 449, n. 7164, p. 819–26, 2007.
- MELO, C. M. L. DE et al. Potential effects of Cramoll 1,4 lectin on murine Schistosomiasis mansoni. **Acta Tropica**, v. 118, n. 2, p. 152–158, 2011.
- MELONI, D. Focusing on The Main Morphological and Physiological Characteristics of the Food-Borne Pathogen *Listeria monocytogenes*. **Journal of Veterinary Science and Research**, v. 1, n. 1, 2014.
- MENGAUD, J. et al. E-cadherin is the receptor for internalin, a surface protein required for entry of *L. monocytogenes* into epithelial cells. **Cell**, v. 84, n. 6, p. 923–32, 1996.
- MICHIELS, K.; VAN DAMME, E. J.; SMAGGHE, G. Plant-insect interactions: What can we learn from plant lectins? **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v. 73, n. 4, p. 193–212, 2010.
- MIKI, K.; MACKANESS, G. B. THE PASSIVE TRANSFER OF ACQUIRED RESISTANCE TO *LISTERIA MONOCYTOGENES*. **Journal of Experimental Medicine**, v. 120, n. 1, p. 93–103, 1964.
- MILLER, D. L.; DOU, C.; RAGHAVENDRAN, K. Anesthetic techniques influence the induction of pulmonary capillary hemorrhage during diagnostic ultrasound scanning in rats. **Journal of Ultrasound in Medicine**, v. 34, n. 2, p. 289–297, 2015.
- MITCHELL, S. W. Researches upon the venom of the rattlesnake: with an investigation of the anatomy and physiology of the organs concerned. **Smithsonian Institution**, v.

135, 1861.

MOREIRA, R. A. et al. Plant lectins, chemical and biological aspects. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 86, p. 211–218, 1991.

MURRAY E. G. D., WEBB R. A., SWANN, M. B. R. A disease of rabbits characterised by a large mononuclear leucocytosis, caused by a hitherto undescribed bacillus *Bacterium monocytogenes* (n.sp.). **Journal Pathology Bacteriolog**, v. 29, n. 1, p. 407–439, 1926.

NORTH, R. J. THE RELATIVE IMPORTANCE OF BLOOD MONOCYTES AND FIXED MACROPHAGES TO THE EXPRESSION OF CELL-MEDIATED IMMUNITY TO INFECTION. **Journal of Experimental Medicine**, v. 132, n. 3, p. 521–534, 1970.

NORTH, R. J. The concept of the activated macrophage. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 121, n. 3, p. 806–9, 1978.

OKUNNU, B. M.; BERG, R. E. Neutrophils Are More Effective than Monocytes at Phagosomal Containment and Killing of *Listeria monocytogenes*. **ImmunoHorizons**, v. 3, n. 12, p. 573–584, 2019.

OLIVEIRA, J. T. A. et al. Cratylia argentea seed lectin, a possible defensive protein against plant-eating organisms: Effects on rat metabolism and gut histology. **Food and Chemical Toxicology**, v. 42, n. 11, p. 1737–1747, 2004.

OLIVEIRA, J. T. A.; CAVADA, B. S.; MOREIRA, R. A. Isolation and partial characterization of a lectin from *Cratylia floribunda* Mart. Seeds. **Ver. Bras. Bot.**, v. 14, p. 61–66, 1991.

OLSON, A. L.; SWIGRIS, J. J. **Idiopathic Pulmonary Fibrosis: Diagnosis and Epidemiology** *Clinics in Chest Medicine*, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22365244>>. Acesso em: 10 fev. 2020

PAMER, E. G. Immune responses to *Listeria monocytogenes*. **Nature Reviews Immunology**, v. 4, n. 10, p. 812–823, 2004.

PASPARAKIS, M. et al. Immune and inflammatory responses in TNF $\alpha$ -deficient mice: A critical requirement for TNF $\alpha$  in the formation of primary B cell follicles, follicular dendritic cell networks and germinal centers, and in the maturation of the humoral immune response. **Journal of Experimental Medicine**, v. 184, n. 4, p. 1397–1411, 1996.

PETROVIĆ, J. et al. Lectin from *Laetiporus sulphureus* effectively inhibits angiogenesis and tumor development in the zebrafish xenograft models of colorectal carcinoma and melanoma. **International Journal of Biological Macromolecules**, 2020.

PEUMANS, W. J.; VAN DAMME, E. J. Lectins as plant defense proteins. **Plant physiology**, v. 109, n. 2, p. 347–352, 1995.

PIRIE, J. H. H. *Listeria*: Change of Name for a Genus Bacteria. **Nature**, v. 145, n. 3668, p. 264–264, 1940.

POSFAY-BARBE, K. M.; WALD, E. R. Listeriosis. **Seminars in Fetal and Neonatal Medicine**, v. 14, n. 4, p. 228–233, 2009.

QUEIROZ, L. P. **Cratylia argentea in Flora do Brasil 2020 em construção**. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB22901>>. Acesso em: 13 jan. 2020.

- QUILLIN, S. J.; SCHWARTZ, K. T.; LEBER, J. H. The novel *Listeria monocytogenes* bile sensor BrtA controls expression of the cholic acid efflux pump MdrT. **Molecular Microbiology**, v. 81, n. 1, p. 129–142, 2011.
- RÁCZ, P.; TENNER, K.; MÉRÖ, E. Experimental *Listeria enteritis*. I. An electron microscopic study of the epithelial phase in experimental listeria infection. **Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology**, v. 26, n. 6, p. 694–700, 1972.
- RAMANI, T. et al. Cytokines: The Good, the Bad, and the Deadly. **International Journal of Toxicology**, v. 34, n. 4, p. 355–365, 2015.
- RAMASWAMY, V. et al. *Listeria* - review of epidemiology and pathogenesis. **Journal of microbiology, immunology, and infection**, v. 40, p. 4–13, 2007.
- RAMOS, M. V. et al. Evaluation of the proteolytic susceptibility of three lectins from subtribe Diocleinae using enzymatic action, heat treatment and molecular modeling. **Journal of Food Biochemistry**, v. 23, n. 5, p. 559–570, 1999.
- RAMOS, M. V. et al. Interaction of diocleinae lectins with glycoproteins based in surface plasmon resonance. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 2, p. 275–279, 2002.
- REDONDO, M. J.; ALVAREZ-PELLITERO, P. The effect of lectins on the attachment and invasion of *Enteromyxum scophthalmi* (Myxozoa) in turbot (*Psetta maxima* L.) intestinal epithelium in vitro. **Experimental Parasitology**, v. 126, n. 4, p. 577–581, 2010.
- RODRIGUEZ, D. et al. Differences in macrophage stimulation and leukocyte accumulation in response to intraperitoneal administration of glucose/mannose-binding plant lectins. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 25, n. 8, p. 823–826, 1992.
- ROGALSKI, M. A. et al. Human drivers of ecological and evolutionary dynamics in emerging and disappearing infectious disease systems. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 372, n. 1712, 2017.
- ROMAGNANI, S. Th1/Th2 cells. **Inflammatory Bowel Diseases**, v. 5, n. 4, p. 285–294, 2007.
- ROTHROCK, M. J. et al. *Listeria* Occurrence in Poultry Flocks: Detection and Potential Implications. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 4, p. 125, 2017.
- RUBY, T. et al. *Salmonella* 's long-term relationship with its host. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 36, n. 3, p. 600–615, 2012.
- RYSER, E. T.; MARTH, E. H. **Listeria, listeriosis, and food safety**. 3. ed. Boca Raton: CRC Press, 2007.
- SÁ, R. A. et al. Antibacterial and antifungal activities of *Myracrodruon urundeuva* heartwood. **Wood Science and Technology**, v. 43, n. 1–2, p. 85–95, 2009.
- ŞANLIBABA, P.; TEZEL, B. U.; ÇAKMAK, G. A. Prevalence and antibiotic resistance of *Listeria monocytogenes* isolated from ready-to-eat foods in Turkey. **Journal of Food Quality**, v. 2018, 2018a.
- ŞANLIBABA, P.; TEZEL, B. U.; ÇAKMAK, G. A. Prevalence and Antibiotic Resistance of *Listeria monocytogenes* Isolated from Ready-to-Eat Foods in Turkey. **Journal of Food Quality**, v. 2018, p. 1–9, 2018b.



- SANTANA, S. S. et al. Eutirucallin, a RIP-2 type lectin from the latex of *Euphorbia tirucalli* L. presents proinflammatory properties. **PLoS ONE**, v. 9, n. 2, 2014.
- SANTOS, A. F. DOS et al. Toxicity of some glucose/mannose-binding lectins to *Biomphalaria glabrata* and *Artemia salina*. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 2, p. 794–798, 2010.
- SANTOS, V. F. et al. Dioclea violacea lectin modulates the gentamicin activity against multi-resistant strains and induces nephroprotection during antibiotic exposure. **International journal of biological macromolecules**, 2019.
- SAUER, J.-D.; HERSKOVITS, A. A.; O'RIORDAN, M. X. D. Metabolism of the Gram-Positive Bacterial Pathogen *Listeria monocytogenes*. **Microbiology Spectrum**, v. 7, n. 4, p. 1–12, 2019.
- SCALLAN, E. et al. Foodborne illness acquired in the United States-Major pathogens. **Emerging Infectious Diseases**, v. 17, n. 1, p. 7–15, 2011.
- SCUDAMORE, C. L. **A Practical Guide to the Histology of the Mouse**. 1. ed. Chichester: JOHN WILEY & SONS, 2014.
- SENOSIAÍN, M.; IBÁÑEZ, L. Protocolo diagnóstico de la hepatomegalia. **Medicine - Programa de Formación Médica Continuada Acreditado**, v. 11, n. 12, p. 720–722, 2012.
- SERBINA, N. V. et al. TNF/iNOS-producing dendritic cells mediate innate immune defense against bacterial infection. **Immunity**, v. 19, n. 1, p. 59–70, 2003.
- SERENO, M. J. et al. Distribution, adhesion, virulence and antibiotic resistance of persistent *Listeria monocytogenes* in a pig slaughterhouse in Brazil. **Food Microbiology**, v. 84, 2019.
- SEVEAU, S. Multifaceted Activity of Listeriolysin O, the Cholesterol-Dependent Cytolysin of *Listeria monocytogenes*. **Sub-cellular biochemistry**, v. 80, p. 161–195, 2014.
- SHILOH, M. U. et al. Phenotype of mice and macrophages deficient in both phagocyte oxidase and inducible nitric oxide synthase. **Immunity**, v. 10, n. 1, p. 29–38, 1999.
- SILVA, A. F. B. et al. Comparison of immunomodulatory properties of mannose-binding lectins from *Canavalia brasiliensis* and *Cratylia argentea* in a mice model of *Salmonella* infection. **International Immunopharmacology**, v. 31, p. 233–238, 2016.
- SKOWRON, K. et al. Characteristics of *Listeria monocytogenes* strains isolated from milk and humans and the possibility of milk-borne strains transmission. **Polish Journal of Microbiology**, v. 68, n. 3, p. 353–369, 2019.
- SLEATOR, R. D. et al. A PrfA-regulated bile exclusion system (BilE) is a novel virulence factor in *Listeria monocytogenes*. **Molecular Microbiology**, v. 55, n. 4, p. 1183–1195, 2005.
- SMIRNOV, Y. A. et al. Prevention and treatment of bronchopneumonia in mice caused by mouse-adapted variant of avian H5N2 influenza A virus using monoclonal antibody against conserved epitope in the HA stem region. **Archives of Virology**, v. 145, n. 8, p. 1733–1741, 2000.
- SOUZA, E. R. N.; TEBALDI, V. M. R.; PICCOLI, R. H. Adaptação e adaptação cruzada de *Listeria monocytogenes* aos compostos eugenol e carvacrol. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 17, n. 4, p. 528–533, 2015.

- SOUZA, M. A. et al. The immunomodulatory effect of plant lectins: A review with emphasis on ArtinM properties. **Glycoconjugate Journal**, v. 30, n. 7, p. 641–657, 2013.
- STILLMARK, H. **Ueber ricin: ein giftiges ferment aus den samen von Ricinus comm. 1. und einigen anderen euphorbiaceen.** [s.l.] University of Dorpat, 1888.
- SU, Y. et al. A novel C-type lectin with a YPD motif from *Portunus trituberculatus* (PtCLec1) mediating pathogen recognition and opsonization. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 106, p. 103609, 2020.
- SUBRAMANIYAN, S. B. et al. Revealing the significance of glycan binding property of *Butea monosperma* seed lectin for enhancing the antibiofilm activity of silver nanoparticles against uropathogenic *Escherichia coli*. **Bioconjugate Chemistry**, v. 31, n. 1, p. 139–148, 2019.
- SUSANA, C. et al. An overview of *Listeria monocytogenes* contamination in ready to eat meat, dairy and fishery foods. **Ciência Rural**, v. 47, n. 2, p. 1–8, 2017.
- UNITT, J.; HORNIGOLD, D. Plant lectins are novel Toll-like receptor agonists. **Biochemical Pharmacology**, v. 81, n. 11, p. 1324–1328, 2011.
- VAN DAMME, E. J. M. et al. Plant lectins: A composite of several distinct families of structurally and evolutionary related proteins with diverse biological roles. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 17, n. 6, p. 575–692, 1998.
- VANDENBORRE, G.; SMAGGHE, G.; VAN DAMME, E. J. M. **Plant lectins as defense proteins against phytophagous insects** *Phytochemistry*, 2011.
- VÁZQUEZ-BOLAND, J. A. et al. *Listeria* Pathogenesis and Molecular Virulence Determinants. **CLINICAL MICROBIOLOGY REVIEWS**, v. 14, n. 3, p. 584–640, 2001.
- VON SON-DE FERNEX, E. et al. In vitro anthelmintic activity of five tropical legumes on the excystment and motility of *Haemonchus contortus* infective larvae. **Experimental Parasitology**, v. 131, n. 4, p. 413–418, 2012.
- WATANABE, A. et al. Characterization of a novel C-type lectin, *Bombyx mori* multibinding protein, from the *B. mori* hemolymph: mechanism of wide-range microorganism recognition and role in immunity. **The Journal of immunology**, v. 177, n. 7, p. 4594–4604, 2006.
- WELEKIDAN, L. N. et al. Prevalence and drug resistance pattern of *Listeria monocytogenes* among pregnant women in Tigray region, Northern Ethiopia: A cross-sectional study. **BMC Research Notes**, v. 12, n. 1, 2019.
- WOODWARD, J. J.; LAVARONE, A. T.; PORTNOY, D. A. C-di-AMP secreted by intracellular *Listeria monocytogenes* activates a host type I interferon response. **Science**, v. 328, n. 5986, p. 1703–1705, 2010.
- ZHANG, J.-M.; AN, J. Cytokines, Inflammation and Pain. **Int Anesthesiol Clin.**, v. 69, n. 2, p. 482–489, 2009.