

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA
RENORBIO**

**LECTINAS VEGETAIS DE *Cratylia argentea* E *Canavalia brasiliensis*
COMO ADJUVANTES TERAPÊUTICOS CONTRA INFECÇÕES POR
*Salmonella***

JACQUELINE ELLEN CAMELO BATISTA ALBUQUERQUE

RECIFE – PE

2017



RENORBIO

**Universidade Federal Rural de Pernambuco
Programa de Pós-graduação em Biotecnologia
Ponto Focal de Recife-PE**

**LECTINAS VEGETAIS DE *Cratylia argentea* E *Canavalia brasiliensis* COMO
ADJUVANTES TERAPÊUTICOS CONTRA INFECÇÕES POR *Salmonella***

Jacqueline Ellen Camelo Batista Albuquerque

Recife – PE

2017



RENORBIO

**Universidade Federal Rural de Pernambuco
Programa de Pós-graduação em Biotecnologia
Ponto Focal de Recife-PE**

**LECTINAS VEGETAIS DE *Cratylia argentea* E *Canavalia brasiliensis* COMO
ADJUVANTES TERAPÊUTICOS CONTRA INFECÇÕES POR *Salmonella***

Jacqueline Ellen Camelo Batista Albuquerque

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia (PPGB) da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como requisito para a obtenção do grau de Doutor em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia em recursos naturais

Linha de pesquisa: Bioprospecção, biodiversidade e conservação

Orientador: Prof. Dr. José Vitor Moreira Lima Filho

Co-orientador: Prof. Dr. Márcio Viana Ramos

Recife-PE

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema Integrado de Bibliotecas da UFRPE
Biblioteca Central, Recife-PE, Brasil

A345L Albuquerque, Jacqueline Ellen Camelo Batista
Lectinas vegetais de *Cratylia argentea* e *Canavalia brasiliensis*
como adjuvantes terapêuticos contra infecções por *Salmonella* /
Jacqueline Ellen Camelo Batista Albuquerque. – 2017.
109 f. : il.

Orientador: José Vitor Moreira Lima Filho.
Coorientador: Márcio Viana Ramos.
Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em
Biotecnologia – RENORBIO, Recife, BR-PE, 2017.
Ponto focal em Pernambuco – Universidade Federal Rural
de Pernambuco..
Inclui referências.

1. ConBr 2. CFL 3. Antígeno capsular Vi 4. Adjuvante
terapêutico 5. Adjuvante vacina, 6. Receptores Toll-Like
I. Lima Filho, José Vitor Moreira, orient. II. Ramos, Márcio Viana,
coorient. III. Título

CDD 620.8

Jacqueline Ellen Camelo Batista Albuquerque

**LECTINAS VEGETAIS DE *Cratylia argentea* E *Canavalia brasiliensis* COMO
ADJUVANTES TERAPÊUTICOS CONTRA INFECÇÕES POR *Salmonella***

Tese apresentada a Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO) para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia em recursos naturais

Aprovado em 14 de março de 2017 por:

.....
Presidente: Prof. Dr. José Vitor Moreira Lima Filho (Orientador - UFRPE)

.....
1º Examinador: Prof. Dr. Márcio Viana Ramos (Co-orientador - UFC)

.....
2º Examinador: Prof. Dr. Cláudio Augusto Gomes da Câmara (Titular - UFRPE)

.....
3º Examinador: Prof. Dr. Valdemiro Amaro da Silva Júnior (Titular - UFRPE)

.....
4º Examinador: Prof. Dr. Jacques Robert Nicoli (Titular - UFMG)

.....
5º Examinador: Prof. Dra. Ana Lúcia Figueiredo Porto (Titular - UFRPE)

Recife-PE

2017

Dedico este trabalho à minha amada família:

Aos meus pais Luzia Camelo e Eúde Batista;

Ao meu irmão Glauber Batista;

Ao meu esposo Antonio Albuquerque.

AGRADECIMENTOS

Meus sinceros votos de agradecimentos a todos que colaboraram para a realização deste trabalho, em especial:

À Universidade Federal Rural de Pernambuco, pela formação profissional.

Às fontes financiadoras: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco (FACEPE), pelo apoio financeiro.

Ao meu orientador Dr. José Vitor Moreira Lima Filho, com o qual eu tive a honra de conviver e trabalhar durante essa longa jornada de estudos e pesquisa no Laboratório de Microbiologia e Imunologia (LAMIM). Agradeço por ter confiado em mim há quase oito anos atrás, quando me presenteou com o seu consentimento para integrar a sua equipe de pesquisa. Sem dúvida, a sua orientação foi essencial para a minha formação acadêmica. Obrigada pelas inúmeras oportunidades durante todos esses anos. Sou muito grata por tudo!

Ao meu co-orientador Dr. Márcio Viana Ramos, pela receptividade em seu laboratório para a obtenção das lectinas vegetais. Agradeço ainda pelo apoio, orientação, sugestões e por ter sido solícito em todos os momentos. Sua co-orientação foi fundamental para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Dr. Pietro Mastroeni, pela oportunidade de realizar parte dos meus experimentos sob a sua supervisão em uma instituição internacional, a Universidade de Cambridge. Essa experiência foi essencial para o meu desenvolvimento pessoal e profissional. Serei eternamente grata pelo seu apoio e sugestões que foram imprescindíveis para o desenvolvimento dessa pesquisa.

À Maria Helena, médica veterinária responsável pelo biotério experimental do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA/UFPE), e ao Laboratório Nacional Agropecuário (LANAGRO/PE), por cederem gentilmente os animais para a realização da presente pesquisa.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, bem como seu corpo docente, funcionários e colegas que contribuíram para a concretização deste trabalho. Em especial, à Profa. Áurea Wischral, por ter sido sempre solícita.

Aos integrantes do Laboratório de Microbiologia e Imunologia (LAMIM), Ana Clarissa, Danielle Cristina, Laísia Andrade, Lethícia Tavares, Paula Fernanda, Taciana Ralph, Rayza Alves e Renata Vaz pela convivência e apoio indispensáveis.

Aos integrantes do grupo de pesquisa do Laboratório de Biologia e Bioquímica de Proteínas Vegetais (UFC), em especial à Ayrles Silva, pelo ensino das técnicas de extração e purificação de lectinas vegetais, e à Carolina Viana, pelo carinho, apoio e convivência durante o período de pesquisa em Fortaleza.

Aos integrantes do Laboratório de infecções bacterianas “BIG LAB”, em especial à Omar Rossi e Srishti Gupta, pela excelente convivência e suporte durante meu período de pesquisa na Inglaterra, na Universidade de Cambridge. Sou muito grata por tudo!

Aos membros da banca examinadora, Dr. Márcio Ramos, Dr. Cláudio Câmara, Dr. Valdemiro Júnior, Dr. Jacques Nicoli e Dra Ana Porto, pela disponibilidade de participar e pelas contribuições acerca deste trabalho de tese.

Aos integrantes do Laboratório de infecções bacterianas “BIG LAB”, em especial à Omar Rossi e Srishti Gupta, pela excelente convivência e suporte durante meu período de pesquisa na Inglaterra, na Universidade de Cambridge. Sou muito grata por tudo!

Às companheiras da pós-graduação, Catarina Ramos e Amanda Alencar, pela amizade e apoio, dividindo as alegrias e angústias vividas durante essa longa jornada do doutorado.

Às amigas Cecília Oliveira, Fernanda Moura e Renata Vaz, pelo suporte em todos os momentos. A amizade de vocês é, sem dúvida, essencial na minha vida.

RESUMO

Lectinas vegetais representam uma classe de proteínas que desempenham diversas atividades biológicas, incluindo a ação imunomoduladora. Recentemente, as lectinas ConBr (*Canavalia brasiliensis*) e CFL (*Cratylia argentea*) demonstraram a capacidade de modular a cascata pró-inflamatória de citocinas, bem como a produção de óxido nítrico em modelo murino de infecção por *Salmonella*. Moléculas imunomoduladoras representam uma alternativa promissora na prevenção e no tratamento de infecções, podendo atuar nos mecanismos imunológicos naturais e adaptativos do hospedeiro, aprimorando a eficácia de antibióticos e vacinas contra patógenos. Diante disso, este estudo avaliou o potencial biotecnológico das lectinas, ConBr e CFL, como adjuvantes terapêuticos, frente ao antígeno vacinal Vi de *S. Typhi*, que tem sido usado com sucesso limitado para imunização contra a febre tifoide. Inicialmente, foram realizados ensaios de citotoxicidade das lectinas em cultura de macrófagos peritoneais murinos para definir as concentrações proteicas não tóxicas de uso nos ensaios. A seguir, os macrófagos foram tratados com as lectinas e infectados por uma cepa virulenta de *Salmonella* Typhimurium. Para tanto, os macrófagos foram incubados com as lectinas ConBr e CFL (1 e 10 µg/mL) antes (tratamento preventivo) ou após (tratamento curativo) infecção experimental com *Salmonella*. Foram realizadas análises de viabilidade celular dos macrófagos, quantificação intracelular bacteriana e expressão gênica de iNOS, citocinas pró- e anti-inflamatórias e receptores Toll-like (TLR2, TLR4 e TLR9). Ambos os tratamentos preventivo e curativo reduziram significativamente a quantificação bacteriana intracelular de *Salmonella* e aumentaram a viabilidade celular dos macrófagos. Os tratamentos preventivos com CFL aumentaram os níveis de transcritos para IL-6 e TNF- α , já ConBr induziu o aumento de IL-12 (p40). No tratamento curativo, CFL induziu expressão significativa de IL-12 (p40), enquanto ConBr aumentou a expressão gênica de IL-1 β e TNF- α . Além disso, o tratamento curativo com CFL foi capaz de aumentar cerca de 130 vezes a expressão de TLR-4 e 24 vezes a expressão de TLR2. Considerando a importância dos receptores TLR2 e TLR4 para o controle da infecção por *Salmonella*, este trabalho avaliou a participação desses receptores na ação imunomoduladora da lectina CFL. Para tanto, macrófagos derivados da medula óssea (BMDM) e duplo nocautes para TLR2/TLR4 foram tratados com a lectina e a expressão gênica das citocinas IL-1 β , TNF- α e IL-6 foi avaliada. Os BMDM demonstraram elevados níveis de expressão gênica, induzindo o aumento de cerca de 258 vezes para IL-1 β , 233 vezes para IL-6 e 25 vezes para TNF- α . No entanto, BMDM duplo nocautes para TLR2/TLR4, produziram níveis significativamente mais baixos de transcritos. Por fim, ConBr e CFL foram testados como adjuvante vacinais em camundongos Swiss imunizados com antígeno Vi purificado, através da avaliação de anticorpos IgG anti-Vi. Os resultados mostraram que as lectinas CFL e ConBr não foram capazes de induzir o aumento no título de anticorpos específicos IgG anti-Vi. Apesar das lectinas não terem demonstrado potencial adjuvante vacinal frente ao antígeno Vi, tais proteínas apresentaram propriedades terapêuticas benéficas no controle de células infectadas por *Salmonella*, além de serem capazes de interagir com receptores do tipo Toll, essenciais na ativação da resposta imune inata e desenvolvimento da resposta adaptativa. Assim, tais resultados representam uma perspectiva promissora para o desenvolvimento de novos fármacos contra *Salmonella*.

PALAVRAS-CHAVE: ConBr, CFL, antígeno capsular Vi, adjuvante terapêutico, adjuvante vacinal, receptores Toll-Like.

ABSTRACT

Plant lectins represent a class of proteins that perform various biological activities, including immunomodulatory actions. In particular, lectins ConBr (*Canavalia brasiliensis*) and CFL (*Cratylia argentea*) have demonstrated an ability to modulate cytokines of the proinflammatory cascade as well as the production of nitric oxide in the murine model of *Salmonella* infection. Immunomodulatory molecules represent a promising alternative in the prevention and treatment of infections and can enhance immunological and adaptive mechanisms of the host improving the efficacy of antibiotics and vaccines against pathogens. This study evaluated the biotechnological potential of the ConBr and CFL as therapeutic and vaccine adjuvants against the antigen Vi from *S. typhi*, which has been used with limited success for immunization against typhoid fever. Initially, cytotoxicity assays with lectins were performed with cultured murine peritoneal macrophages to define non-toxic protein concentrations for assays. Then, macrophages were treated with lectins and infected with a virulent strain of *Salmonella* Typhimurium. For this purpose, macrophages were incubated with ConBr and CFL lectins (1 and 10 µg / mL) before (preventive treatment) or after (curative treatment) the onset of infection. The following analyses were conducted: macrophage cell viability, intracellular bacterial quantification, iNOS plus pro- and anti-inflammatory cytokines and Toll-like receptors (TLR2, TLR4 and TLR9) gene expression. Both preventive and curative treatments significantly reduced the intracellular bacterial load and increased cell viability of infected macrophages. In the preventive treatment with CFL there was an increase in the level of transcripts for IL-6 and TNF-α, whereas ConBr induced an increase of IL-12 (p40). In the curative treatment, CFL induced significant expression of IL-12 (p40), whereas ConBr increased gene expression of IL-1β and TNF-α. In addition, the curative treatment with CFL increased approximately 130 fold the expression of TLR-4 and 24 fold expression of TLR2. In view of the importance of the TLR2 and TLR4 for the control of *Salmonella* infection, we evaluated the participation of these receptors in the immunomodulatory action of the CFL. Thus, bone marrow-derived macrophages (BMDM) knockout for TLR2/TLR4 were treated with the lectin and gene expression for IL-1β, TNF-α and IL-6 cytokines was evaluated. Naïve BMDM demonstrated high levels of gene expression, increasing 258-fold the number of transcripts for IL-1β, 233-fold for IL-6, and 25-fold for TNF-α. Conversely, double knockout BMDM for TLR2/TLR4 produced low levels of transcripts. Finally, ConBr and CFL were tested as vaccine adjuvants in Swiss mice immunized with the purified Vi antigen through evaluation of anti-Vi IgG antibodies. The results showed that as CFL and ConBr lectins were not able to induce an increase of specific IgG anti-Vi antibodies. Although the lectins did not demonstrate a potential as vaccine adjuvant against the Vi antigen, they showed therapeutic properties beneficial to the control of *Salmonella*-infected macrophages and were capable to interact with Toll-like receptors, which play a key role on activation of innate immune response and development of adaptive immune response. Such results represent a promising prospect for the development of new drugs against *Salmonella*.

KEYWORDS: CFL, ConBr, Vi antigen, therapeutic adjuvant, vaccine adjuvant, Toll-Like receptors.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Viabilidade celular após a exposição de macrófagos peritoneais às lectinas de *Canavalia brasiliensis* (ConBr) e *Cratylia argentea* (CFL).....58
- Figura 2.** Expressão de RNAm para citocinas e enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOs) em macrófagos peritoneais cultivados com as lectinas ConBr e CFL durante 24 h.....59
- Figura 3.** Expressão de RNAm para citocinas em esplenócitos após o estímulo com sobrenadantes de macrófagos peritoneais previamente expostos a ConBr e CFL.....60
- Figura 4.** Efeito de ConBr e CFL no controle de infecção por *Salmonella* nos tratamentos preventivo. A) Carga bacteriana intracelular; B) Viabilidade celular de macrófagos; C-F) Expressão gênica de citocinas.....61
- Figura 5.** Efeito de ConBr e CFL no controle da infecção por *Salmonella* através do tratamento curativo. A) Carga bacteriana intracelular; B) Viabilidade celular de macrófagos; C-H) Expressão gênica de citocinas.....62
- Figura 6.** Expressão de RNAm de receptores tipo Toll em macrófagos peritoneais infectados com *S. Typhimurium* e tratados com as lectinas ConBr e CFL (Tratamento preventivo e curativo).....63
- Figura 7.** Viabilidade celular após a exposição de BMDM à lectina de *Cratylia argentea* (CFL).....78
- Figura 8.** Expressão gênica de citocinas em macrófagos derivados da medula óssea naive e duplo nocaute TLR2/TLR4 tratados com a lectina vegetal CFL (20 µg/ml) após 8 h de exposição.....79
- Figura 9.** IgG sérica anti-Vi quantificada por ELISA indireto.....89

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Sequências dos iniciadores utilizados para PCRq em ensaios de expressão gênica.....	64
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA – Análise de variância
APCs – Células apresentadoras de antígenos
ATCC – American Type Culture Collection
BHI – Caldo infusão cérebro coração
BMDM – Macrófagos derivados da medula óssea
Células NK – Linfócitos natural killer
Células T CD4+ - Células T auxiliares
Células T CD8+ - Células T citotóxicas
CFL – Lectina de *Cratylia argentea*
ConA – Concanavalina A, Lectina de *Canavalia ensiformis*
ConBr – Lectina de *Canavalia brasiliensis*
DAMPs – Padrões moleculares associados a danos
DMEM – Meio Dulbecco's Modified Eagle Medium
ELISA – Ensaio imunoenzimático
IFN- γ – Interferon gama
IgG – Imunoglobulina G
IKK – Complexo de quinase induzível
IKKi – Inibidor de kinase NF- κ B
IL-1 β – Interleucina 1-beta
IL-1R – Receptor da interleucina 1
IL-2 – Interleucina 2
IL-4 – Interleucina 4
IL-5 – Interleucina 5
IL-6 – Interleucina 6
IL-10 – Interleucina 10
IL-12 – Interleucina 12
IL-13 – Interleucina 13
iNOS – enzima óxido nítrico sintase
IRAK – Quinase associada ao IL-1R
LIKA – Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami
LPS – Lipopolissacarídeo

LRRs – Sequências repetidas ricas em leucina
MAP quinase – Proteíno-quinases ativadas por mitógenos
MØp – Macrófagos peritoneais
MyD88 – Proteína adaptadora fator de diferenciação mielóide 88
NF-κB – Fator nuclear kappa B
NO – Óxido nítrico
NTS – Sorotipos não-tifoides
PAMPs - Padrões moleculares associados a patógenos
PBMC - Células mononucleares do sangue periférico
PBS – Solução salina fosfatada tamponada
PRRs – Receptores de Reconhecimento de Padrões
RNAm – Ácido ribonucleico mensageiro
ROIs - Derivados oxidativos da cadeia respiratória
RPMI – Meio Roswell Park Memorial Institute
RT-PCR – Reação em cadeia da polimerase em tempo real
SCV – Vacúolo contendo *Salmonella*
SPI-1 – Ilha de patogenicidade do tipo 1
SPI -2 – Ilha de patogenicidade do tipo 2
T3SS – Sistema de secreção do tipo III
TAB/TAB 1 – Proteínas de ligação à TAK1
TAK1 – Quinase 1ativadora do fator transformador de crescimento β
TBK1 – Quinase 1 que se liga a TANK
Th1 – Resposta celular do tipo-1
Th2 – Resposta celular do tipo-2
TIR – Domínio receptor Toll/IL1
TLRs – Receptores do tipo Toll-Like
TLR2 – Receptor Toll-like 2
TLR4 – Receptor Toll-like 4
TLR9 – Receptor Toll-like 9
TNF-α – Fator de necrose tumoral alfa
TRAF6 – Fator 6 associado ao receptor de TNF
TRIF – IFN-β indutor de adaptador e possuidor do domínio TIR
UFC – Unidades formadoras de colônias

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA

AGRADECIMENTOS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

RESUMO

ABSTRACT

1. INTRODUÇÃO.....	14
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	17
2.1 Lectinas Vegetais.....	17
2.1.1 As lectinas de <i>Canavalia brasiliensis</i> e <i>Cratylia argentea</i>	19
2.1.2 Potencial imunomodulatório de Lectinas vegetais.....	21
2.1.3 Lectinas vegetais e os receptores Toll-like.....	23
2.1.4 Uso de lectinas vegetais como adjuvantes vacinais.....	26
2.2 O gênero <i>Salmonella</i>.....	27
2.2.1 Resposta imune do hospedeiro contra <i>Salmonella</i>	29
2.2.2 Febre tifoide.....	31
2.2.3 Formulações vacinais contra a febre tifoide.....	33
2.2.3.1 Antígeno Vacinal Vi.....	35
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	36
4. CAPÍTULOS.....	38
Capítulo I: Lectinas vegetais ConBr e CFL modulam a expressão de citocinas pró-inflamatórias e reduzem a carga bacteriana em macrófagos infectados com <i>Salmonella enterica</i> sorotipo Typhimurium.....	38
Capítulo II: Receptores do tipo Toll-like estão envolvidos na ativação de macrófagos causada pela lectina vegetal de <i>Cratylia argentea</i> (CFL).....	65
Capítulo III: Efeito imunoadjuvante das lectinas vegetais CFL e ConBr frente ao antígeno vacinal Vi de <i>Salmonella Typhi</i>.....	80
5. CONCLUSÃO.....	91
6. ANEXOS: Comprovante de publicação de artigo.....	109

1. INTRODUÇÃO

Lectinas vegetais são proteínas capazes de se ligar reversivelmente à carboidratos específicos. Diversos efeitos biológicos têm sido atribuídos à essas proteínas, tais como atividade antitumoral (FU *et al.*, 2011), antibacteriana (CHARUNGCHITRAK *et al.*, 2011), antioxidante (JIMENEZ *et al.*, 2014), inseticida (AFOLABI-BALOGUN *et al.*, 2012), anti-inflamatória (SILVA *et al.*, 2010), efeito vasodilatador (ASSREUY *et al.*, 2009), adjuvante (CARDOSO *et al.*, 2012), entre outras.

Souza e colaboradores (2013) apresentaram um estudo de revisão em que descrevem diversas lectinas vegetais com potencial de ativar células imunológicas e induzir a produção de citocinas inflamatórias. Substâncias capazes de modular a resposta imunológica representam uma alternativa promissora para a prevenção e tratamento de infecções, podendo atuar nos mecanismos imunológicos naturais e adaptativos do hospedeiro e aprimorar a eficácia dos antibióticos e vacinas, sendo então denominados de adjuvantes terapêuticos. A essa nova ferramenta de estudos dá-se o nome de terapia adjuvante. Essa terapia visa essencialmente iniciar ou aprimorar a imunidade antimicrobiana enquanto limita os danos causados pela inflamação (HANCOCK *et al.*, 2010; MAISONNEUVE *et al.*, 2014).

As lectinas das leguminosas *Cratylia argentea* (CFL) e *Canavalia brasiliensis* (ConBr) são glicose/manose específicas e têm sido investigadas quanto ao seu potencial imunomodulatório. Por exemplo, Silva e colaboradores (2011) demonstraram o potencial imunomodulatório da lectina ConBr em ensaios *in vitro*, onde tal lectina foi capaz de induzir o aumento na produção das citocinas interleucina-2 (IL-2), interleucina-6 (IL-6) e interferon-gama (IFN- γ) e uma diminuição na produção de interleucina-10 (IL-10), além da liberação de óxido nítrico (NO) em cultura de esplenócitos murinos. Tal potencial está relacionado à capacidade de interação entre as lectinas e açúcares presentes na superfície de células imunológicas, resultando na transdução de sinal e consequente produção de citocinas (LAN; NG, 2011).

Além da produção de mediadores inflamatórios, ConBr tem demonstrado potencial para estimular a ativação de células T (BARBOSA *et al.*, 2001; BARRALNETO *et al.*, 1992) e induzir o recrutamento de macrófagos em experimento de imunização contra infecção causada por *Leishmania amazonensis* (TEIXEIRA *et al.*,

2006). Já a lectina CFL, quando utilizada em modelo de inflamação de edema de pata murino, foi capaz de inibir a migração de neutrófilos (ASSREUY *et al.*, 1997). Além disso, tal proteína induziu níveis intermediários de proliferação de linfócitos por células mononucleares de sangue periférico (PBMC) (BARRAL-NETO *et al.*, 1992).

Recentemente, Silva e colaboradores (2016) demonstraram que ambas as lectinas ConBr e CFL são fitoterápicos capazes de modular a cascata de citocinas pró e anti-inflamatórias, além de produzir óxido nítrico, após infecção de camundongos suíços por uma cepa virulenta de *Salmonella* Typhimurium. Esses resultados são de grande relevância, pois sugerem que tais moléculas representam uma alternativa promissora para o uso na terapia adjuvante contra *Salmonella*.

Os membros pertencentes ao gênero *Salmonella* são patógenos intracelulares facultativos capazes de sobreviver dentro de fagócitos, tais como macrófagos e células dendríticas. Tal gênero possui diversas espécies de importância médica, incluindo *Salmonella* Typhi. Essa espécie é o agente causador da febre tifoide, uma doença febril aguda transmitida através de água e alimentos contaminados (ONWUEZOBE *et al.*, 2012). O tratamento contra essa enfermidade em adultos é feito com o uso de fluoroquinolonas (CHINH *et al.*, 2000). Todavia, o surgimento de resistência à essa classe de antibióticos tem se tornado um problema de saúde pública, particularmente nos países em desenvolvimento (ZAKI; KARANDE, 2011). Desta forma, a vacinação em áreas endêmicas é uma alternativa eficaz na prevenção da doença.

Atualmente, duas vacinas estão amplamente licenciadas para uso contra a febre tifoide, a vacina atenuada Ty21a (Vivotif, PaxVax) e o antígeno capsular Vi purificado (Typhim Vi, produzida pela Sanofi Pasteur) (JACKSON *et al.*, 2015). Tais vacinas têm como desvantagens o tempo de memória imunológica limitado e o fato de não possuírem alto poder imunogênico, além de não induzirem proteção eficaz contra a febre tifoide em crianças menores de 2 anos, grupo onde a incidência é comprovadamente alta (GUZMAN *et al.*, 2006; SINHA *et al.*, 1999).

Com vistas ao desenvolvimento de uma nova formulação vacinal que confira maior tempo de proteção imunológica, novos conjugados têm sido pesquisados (MACLENNAN *et al.*, 2014). Vacinas conjugadas apresentam maior eficácia, já que têm o potencial de recrutar células T para a produção de anticorpos contra o antígeno Vi (MICOLI *et al.*, 2011). Por exemplo, a vacina do antígeno Vi conjugada à

exoproteína recombinante A de *Pseudomonas aeruginosa* Vi-(rEPA) tem demonstrado alta eficácia em crianças (LIN *et al.*, 2001). Tal vacina encontra-se licenciada, mas seu uso ainda está restrito à alguns países (SZU, 2013). Outras moléculas têm sido testadas como adjuvantes vacinais do antígeno Vi, no entanto não há relatos de estudos co-administrando lectinas vegetais como potencializadores desta resposta.

Diante do exposto, o presente trabalho objetivou investigar o potencial biotecnológico das lectinas de leguminosas ConBr (*Canavalia brasiliensis*) e CFL (*Cratylia argentea*) como adjuvantes terapêuticos contra *Salmonella*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Lectinas Vegetais

A diversidade molecular no reino vegetal oferece uma grande fonte de compostos com atividades promissoras no campo terapêutico, incluindo as lectinas vegetais. Tais proteínas constituem um importante grupo de moléculas, particularmente devido às diversas propriedades biológicas atribuídas a elas. As lectinas (termo derivado do latim “legere”, que significa “para selecionar”) são um grupo de proteínas de origem não-imunológica capazes de se ligar específica e reversivelmente a carboidratos (GOLDSTEIN *et al.*, 1980).

Lectinas vegetais têm demonstrado diversas atividades, tais como ação antitumoral, antimicrobiana, antioxidante, inseticida, antinociceptiva, anti-inflamatória e vasodilatadora (AFOLABI- ASSREUY *et al.*, 2009; BALOGUN *et al.*, 2012;; CHARUNGCHITRAK *et al.*, 2011; FU *et al.*, 2011; JIMENEZ *et al.*, 2014; SILVA *et al.*, 2010). Além disso, tais proteínas estão envolvidas na identificação de grupos sanguíneos, aglutinação de micro-organismos e estimulação mitogênica de células imunológicas (CHAN *et al.*, 2012; DELBAERE *et al.*, 1990; RAMOS *et al.*, 2016). Ainda, as lectinas vegetais possuem potencial terapêutico, podendo ser utilizadas como instrumentos para o diagnóstico, profilaxia e tratamento de diversas doenças (MAJEE; BISWAS, 2013).

A definição de lectinas atualmente mais utilizada caracteriza tais moléculas como proteínas que possuem no mínimo um domínio não-catalítico que se liga reversivelmente a mono ou oligossacarídeos específicos (PEUMANS; VAN DAMME, 1995). A classificação das lectinas é feita de acordo com as suas características estruturais, estando subdividas em quatro classes distintas: as merolectinas, hololectinas, quimerolectinas e superlectinas (VAN DAMME *et al.*, 2008). As merolectinas possuem exclusivamente um único domínio ligante a carboidratos e não são capazes de precipitar ou aglutinar células devido à sua estrutura proteica monovalente. Como exemplo desse subtipo estão as heveínas, lectinas isoladas da espécie *Hevea brasiliensis* (VAN PARIJS *et al.*, 1991). Já as hololectinas possuem dois sítios de ligação a carboidrato, sendo capazes de se ligar a um ou mais carboidratos semelhantes estruturalmente. As lectinas pertencentes a essa classe são

capazes de aglutinar células ou precipitar glicoconjugados. Tal classe tem sido a mais estudada, pois inclui a maioria das lectinas de plantas conhecidas. Por exemplo, a lectina ConBr de *Canavalia brasiliensis*. As quimerolectinas são proteínas que, além do domínio ligante de carboidrato, possuem outro domínio de função distinta, agindo este último independentemente do domínio de ligação a carboidratos. Quanto ao número de sítios de ligações a açúcares, as proteínas classificadas como quimerolectinas agem como merolectinas ou hololectinas (PEUMANS; VAN DAMME, 1995). Por fim, as superlectinas foram a classe mais recentemente descrita e são caracterizadas como proteínas que possuem mais de um sítio de ligação a carboidratos, entretanto, esses possuem diferenças estruturais (VAN DAMME *et al.*, 1998).

A distribuição das lectinas se apresenta de maneira ubíqua na natureza, sendo encontrada em animais, micro-organismos e plantas. No reino vegetal, tais proteínas podem ser encontradas em algas (AINOUZ; SAMPAIO, 1993) musgos (MOLINA; VICENTE, 1995), gimnospermas (SANTI-GADELHA *et al.*, 2006) e angiospermas (KAUR *et al.*, 2005). As lectinas extraídas de plantas têm sido bastante estudadas e caracterizadas quanto às suas funções e estruturas, especialmente aquelas isoladas da família Leguminosae. Sua principal fonte são as sementes maduras, particularmente nos cotilédones, local cuja função consiste na reserva de nutrientes utilizados durante o processo germinativo. As lectinas representam cerca de 2 a 10% do total de proteínas presentes nas sementes (DIAZ *et al.*, 1999). No entanto, essas proteínas podem ser isoladas de outros tecidos da planta, como raiz (NAVARRO; PEREZ, 1990), folhas (SHIMOKAWA *et al.*, 2016), fruta (WEARNE *et al.*, 2013), flores (SUSEELAN *et al.*, 2002) e casca (MACIEL *et al.*, 2012).

A família Leguminosae (Fabaceae s.l.) constitui uma das maiores famílias de fanerógamas, sendo reconhecidos atualmente 727 gêneros e cerca de 19.325 espécies (LEWIS *et al.* 2005). Apesar de apresentar sequências de aminoácidos bastante similares, as lectinas de leguminosas diferem quanto à sua especificidade de ligação a hidratos de carbono (VAN DAMME *et al.*, 1998). Dentro da família Leguminosae está a subtribo Diocleinae, constituída por 13 gêneros: *Calopogonium*, *Camptosema*, *Canavalia*, *Cratylia*, *Cleobulia*, *Collaea*, *Cymbosema*, *Dioclea*, *Galactia*, *Herpyza*, *Luzonia*, *Macropsychnanthus* e *Pachyhizus* (POLHILL, 1981). De maneira geral, as lectinas pertencentes à subtribo Diocleinae possuem estruturas multiméricas

compostas de monômeros de 25,5 KDa e exibem a característica dímero-tetrâmero dependente de pH (CALVETE *et al.*, 1999). Tais moléculas se caracterizam como metaloproteínas, pois requerem íons divalentes (Ca²⁺ e Mn²⁺) para desenvolver completamente seus efeitos biológicos (SANZ-APARÍCIO *et al.*, 1997). Todas as lectinas dessa subtribo possuem como especificidade principal de reconhecimento os carboidratos D-manose e D-glicose (CAVADA *et al.*, 2001).

A reatividade de várias lectinas presentes na subtribo Diocleinae foi avaliada por Ramos e colaboradores (2002), comprovando que, embora tais proteínas possuam afinidade para os mesmos carboidratos, essas lectinas possuem flexibilidade em suas especificidades finas, pois interagem com uma ampla variedade de carboidratos simples e podem reconhecer também estruturas glicanas complexas e com diferentes conformações estruturais.

A lectina concanavalina A, purificada a partir das sementes de *Canavalia ensiformis*, foi a primeira lectina a ser isolada (SUMMER; HOWEL, 1936), sequenciada e caracterizada quanto à sua estrutura tridimensional determinada por cristalografia de raio-x (DEREWENDA *et al.*, 1989). Assim, tal lectina tem sido a melhor caracterizada até o momento (CAVADA *et al.*, 2001). Outras lectinas com similaridade à ConA têm sido isoladas das sementes de espécies da mesma subtribo Diocleinae. Dentre elas, estão as lectinas ConBr e CFL isoladas das espécies *Canavalia brasiliensis* e *Cratylia argentea*, respectivamente.

2.1.1. As lectinas de *Canavalia brasiliensis* e *Cratylia argentea*

Canavalia brasiliensis Mart. ex Benth (Fabaceae) é conhecida popularmente como feijão bravo do Ceará, encontrada nas regiões Sudeste e Nordeste do Brasil e adaptada a solos de baixa fertilidade (CRUZ *et al.*, 1995). ConBr, a lectina isolada das sementes de *C. brasiliensis*, é uma proteína constituída de 237 resíduos de aminoácidos que possui heterogeneidade na posição 96 (Ser/Thr), sugerindo a existência de duas isoformas (MOREIRA; CAVADA, 1984). Tal lectina é caracterizada como um monômero constituído de um polipeptídeo 30KDa (cadeia α) e por duas porções de fragmentos pequenos de 16KDa e 12KDa (cadeias β e γ , respectivamente) (GRANGEIRO *et al.*, 1997).

ConBr tem sua estrutura cristalográfica definida e possui 99% de similaridade na estrutura primária quando comparada a lectina de *Canavalia ensiformis* (ConA), representante da mesma família que possui idêntica especificidade de carboidratos ligantes (GRANGEIRO, 1996). A estrutura molecular de ConBr pode variar em dímero e tetrâmero, dependendo do pH (GRANGEIRO *et al.*, 1997). Além disso, tal lectina possui especificidade para D-glicose, D-manose e derivados, porém essa proteína tem ainda afinidade por cadeias ramificadas de trimanosídeo, 3,6-di-O-(- α -D-manopiranosil)-D-manose, os quais são encontradas em regiões-núcleo de todos os carboidratos ligados a asparagina (N-Ligados) (DAM *et al.*, 2000).

A interação de ConBr com receptores glicosilados presentes nas superfícies celulares resulta em diversas atividades biológicas, tais como: atividade antitumoral (FAHEINA-MARTINS *et al.*, 2012), cicatrizante (SILVA *et al.*, 2009), neuroprotetora (JACQUES *et al.*, 2013; RUSSI *et al.*, 2012), antidepressiva (BARAUNA *et al.*, 2006), antinociceptiva (PIRES *et al.*, 2011) e vasodilatadora (ASSREUY *et al.*, 2009). Devido aos diversos efeitos biológicos atribuídos à ConBr, tal proteína tem sido amplamente utilizada como ferramenta em pesquisas de biologia celular e imunologia.

A espécie vegetal *Cratylia argentea* (sinônimos: *Cratylia desvauxii*, *Cratylia dichrona*, *Cratylia floribunda*, *Cratylia nitens*, *Cratylia nutans*, *Cratylia pauciflora*, *Dioclea dichrona* e *Dioclea pauciflora*) pertence à subtribo Diocleinae (Fabaceae). Tal espécie é um arbusto nativo da Amazônia, sendo encontrada em cerrados-caatinga e florestas sazonais e são exclusivas da América do Sul (QUEIROZ, 2016b). A partir das sementes dessa espécie é obtida a lectina denominada CFL, uma hololectina caracterizada por três grupos de bandas proteicas em torno de $25,397 \pm 3$ para a cadeia α , $12,847 \pm 2$ para o fragmento β e $12,568 \pm 2$ Da para o fragmento γ (CALVETE *et al.*, 1999). Tal lectina pode ser isolada através de cromatografia de afinidade em coluna de sephadex-G50, sendo eluída em tampão de glicose, já que possui afinidade pelos carboidratos D-glicose e D-manose (OLIVEIRA *et al.*, 1991).

A lectina CFL tem sido bastante estudada quanto a sua estrutura, entretanto pouco pesquisada no que se refere aos seus efeitos biológicos. Dentre as principais atividades, destacam-se: efeito citotóxico e genotóxico em linhagem de células tumorais resistentes (FAHEINA-MARTINS *et al.*, 2011), efeito antibiofilme resultante da inibição na adesão de estreptococos (TEIXEIRA *et al.*, 2006), efeito anti-inflamatório mediado por neutrófilos em modelos clássicos de inflamação (ASSREUY

et al., 1997), efeito proliferativo em linfócitos e produção de IFN- γ (BARRAL-NETO *et al.*, 1992) e secreção de histamina (GOMES *et al.*, 1994). Além disso, tal lectina foi capaz de alterar os parâmetros hemodinâmicos renais, demonstrando um efeito caliurético (HAVT *et al.*, 2015).

2.1.2 Potencial imunomodulatório de Lectinas vegetais

A constante ameaça de doenças infecciosas remete a busca contínua para o desenvolvimento de novas terapias a fim de combater micro-organismos patogênicos, já que os antibióticos estão perdendo sua efetividade rapidamente com o surgimento de bactérias multirresistentes. Assim, o controle de infecções através da modulação da resposta imunológica do hospedeiro com o uso de produtos naturais terapêuticos consiste em uma nova estratégia no combate aos agentes infecciosos. Tais moléculas são denominadas adjuvantes terapêuticos, também conhecidos como imunomoduladores, que podem ser utilizados isoladamente ou co-administrados com antibióticos (HANCOCK *et al.*, 2012). Nesse âmbito, são crescentes os trabalhos demonstrando o potencial imunomodulatório das lectinas vegetais.

Estudo realizado por Souza e colaboradores (2013) descreve de maneira geral diversas lectinas vegetais com propriedades imunomoduladoras e os mecanismos responsáveis por esses efeitos. Tal atividade está relacionada a capacidade de interação dessas proteínas com carboidratos presentes na superfície de células imunes. Essa interação pode desencadear a transdução de sinal induzindo a produção de citocinas e a resposta imunológica eficaz contra tumores ou infecções microbianas (LAM; NG, 2011).

Citocinas são definidas como uma família ampla e diversa de pequenas proteínas, que possuem um efeito específico na interação e comunicação entre células. Tais proteínas são capazes de influenciar ambas as respostas imunológicas inata e adquirida, sendo as células T auxiliares e os macrófagos as duas principais populações celulares produtoras dessas moléculas (ZHANG; JIANXIONG, 2007). Pequenas concentrações de lectinas são suficientes para induzir a modulação da resposta imune através da produção de citocinas anti- ou pró- inflamatórias (UNITT; HORNIGOLD, 2011).

De acordo com Souza e colaboradores (2013), as lectinas vegetais podem induzir resposta celular do tipo-1 (Th1) ou do tipo-2 (Th2). O perfil de células Th1 é caracterizado por secretar as citocinas IFN- γ e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), o que torna esse tipo de células efetoras contra infecções intracelulares causadas por micro-organismos que são capazes de se desenvolver dentro de macrófagos (KIDD, 2008). As lectinas *Canavalia ensiformis* (ConA), *Phaseolus vulgaris* (PHA-E e PHA-L), *Pisum sativum* (PSA) e *Triticum vulgare* (WGA) mostraram-se capazes de desenvolver esse tipo de resposta (Th1) em ensaios *in vitro*, utilizando cultura de esplenócitos murinos (MURAILLE *et al.*, 1999).

Já a resposta do tipo Th2 é caracterizada por induzir a secreção de interleucina-4 (IL-4), interleucina-5 (IL-5), interleucina-10 (IL-10) e interleucina-13 (IL-13), que são responsáveis pela elevada produção de anticorpos, ativação de eosinófilos e inibição de várias funções oriundas dos macrófagos, resultando numa resposta independente da ação dos macrófagos. Esse perfil de células (Th2) está associado à resposta contra parasitas (ROMAGNANI, 1999). Rogerio e colaboradores (2007) verificaram que a lectina ScLL da espécie *Synadenium carinatum* (ScLL) foi capaz desenvolver a resposta do tipo Th2, resultando na redução do influxo de leucócitos e produção de IL-10 em modelo inflamatório de asma.

No que se refere ao potencial imunomodulatório de ConBr, Silva e colaboradores (2011) demonstraram que a lectina foi capaz de induzir um aumento na produção das citocinas interleucina-2 (IL-2), interleucina-6 (IL-6) e IFN- γ e uma diminuição da produção de IL-10, além da liberação de óxido nítrico em cultivo celular de esplenócitos murinos. Além disso, Barral-Netto (1992) verificou que tal lectina foi capaz de estimular a proliferação de linfócitos T e a produção de IFN- γ em ensaios com células mononucleares do sangue periférico (PBMC). Rodriguez (1992) demonstrou que ConBr tem efeitos mais pronunciados na estimulação de proliferação celular de macrófagos peritoneais murinos em resposta à administração intraperitoneal. Já Andrade e colaboradores (1999) mostraram que ConBr foi capaz de induzir o aumento de óxido nítrico (NO) em cultivo celular de macrófagos, quando a proteína é administrada via intraperitoneal em murinos.

Recentemente, o potencial imunomodulatório das lectinas CFL e ConBr foi avaliado em modelo murino de infecção por *Salmonella* (SILVA *et al.*, 2016). Tais lectinas foram capazes de modular a cascata de citocinas pró e anti-inflamatórias, bem

como a produção de NO após a infecção de camundongos suíços por uma cepa virulenta de *Salmonella enterica* Sor. Typhimurium. Ainda, pré-tratamentos dessas lectinas foram capazes de reduzir a carga bacteriana nos órgãos internos e aumentar a taxa de sobrevivência dos animais.

2.1.3 Lectinas vegetais e os receptores Toll-Like (TLRs)

O potencial imunomodulatório de lectinas vegetais tem sido associado à uma classe de receptores de reconhecimento padrão (PRRs), denominada receptores Toll-Like (TLRs) (SILVA; CORREIA, 2014). O primeiro relato sobre a existência dos PRRs da resposta imune inata foi feito por Charles Janeway (1989), em seu trabalho de monografia. O pesquisador propôs que tais receptores não somente reconheceriam as substâncias microbianas, como também participariam da sinalização intracelular (JANEWAY, 2002). Em 1996, a proteína Toll foi identificada em insetos do gênero *Drosophila*, cuja função foi relacionada à proteção das moscas contra as infecções fúngicas (LEMAITRE *et al.*, 1996). Em 1997, o primeiro homólogo da proteína Toll foi identificado e caracterizado em humanos, recebendo a denominação de hToll, mais tarde renomeado de TLR4 (MEDZHITOV *et al.*, 1997).

TLRs são glicoproteínas integrais de membrana tipo I, que possuem sequências repetidas ricas em leucina (LRRs), flanqueada por motivos enriquecidos em cisteína (TAKEDA *et al.*, 2003). Tais proteínas são altamente conservadas e estão localizadas na membrana plasmática ou estruturas endossomais de células imunológicas, tais como células endoteliais, monócitos, macrófagos, neutrófilos, linfócitos B, além de outros grupos celulares. À nível molecular, esses receptores são capazes de reconhecer tecidos danificados, através dos padrões moleculares associados a danos (DAMPs), e micro-organismos, através dos padrões moleculares associados à patógenos (PAMPs), incluindo peptídeos, lipídeos e ácidos nucleicos (KUMAR *et al.*, 2011).

Os TLRs constituem um mecanismo essencial para a ativação de células imunológicas, que pode resultar na expressão de citocinas pró-inflamatórias, tais como IL-6, interleucina-1 β (IL-1 β) e TNF- α , e recrutamento de células do sistema imune do sangue para o sítio de infecção. Além disso, as células ativadas via TLRs são capazes de induzir mecanismos microbicidas da imunidade inata, tais como a

produção de espécies reativas de oxigênio e peptídeos antimicrobianos relacionadas à ativação de células fagocíticas (HANCOCK *et al.*, 2012; MAISONNEUVE *et al.*, 2014).

No homem, 10 tipos de TLRs têm sido descritos (TLR1-TLR10), já em camundongos existem 13 diferentes TLRs (TLR1-9, TLR11-13) (AKIRA *et al.*, 2006). Os variados PAMPs podem ser reconhecidos por diferentes TLRs, incluindo o RNA viral de dupla fita (TLR3), lipopeptídeos (o receptor heterodímero TLR2 associado à TLR1 ou TLR6), o lipopolissacarídeo (LPS) (TLR4), a flagelina bacteriana (TLR5), o RNA viral ou bacteriano de fita simples (TLR7 e TLR8) e DNA não metilado rico em CpG (TLR9), dentre outros. Apesar dos TLRs estarem presentes em vários tipos de células, eles estão em localizações diferentes nas células. Os receptores TLR1, TLR2, TLR5 e TLR6 estão presentes na superfície celular, enquanto TLR3, TLR7, TLR8 e TLR9 são expressos em endossomos no meio intracelular (KUMAR *et al.*, 2009). O receptor TLR4 pode ser expresso tanto na superfície celular quanto nos endossomos (JIN; LEE, 2008).

O reconhecimento dos ligantes pelos TLRs desencadeará uma cascata de sinalização que irá resultar na produção de citocinas pró-inflamatórias e, no caso dos TLRs endossomais, na indução de IFN do tipo 1 (O'NEILL, *et al.*, 2013). Inicialmente, ocorre o recrutamento de proteínas adaptadoras, que irão se associar através de seu domínio comum ao receptor Toll/IL1 (TIR) ao TIR do TLR. Com exceção do TLR3, todos os demais TLRs irão recrutar a proteína adaptadora fator de diferenciação mielóide 88 (MyD88). Tal proteína poderá se associar a uma outra proteína adaptadora, denominada IRAK (quinase associada ao IL-1R). Então, IRAK interage com outra quinase TRAF6, ativando TAK1, que irá se associar a proteínas TAB. Dentre tais proteínas, a TAB1 ativará o complexo quinásico IKK, resultando na fosforilação de I κ B e deslocamento do fator nuclear kappa B (NF- κ B), que estava inicialmente inativo no citoplasma, para o núcleo celular, onde promoverá a transcrição de genes relacionados à resposta inflamatória, tais como TNF- α e IFN. A TAK1 também irá ativar membros inclusos na família das MAP quinase, dentre eles JNK, p38 e ERK, que poderá ativar outro fato transcricional, denominado AP-1 (BECKER; O'NEILL, 2007). Já os receptores TLR3 e TLR4 são capazes de recrutar um adaptador diferente, denominado TRIF, que causará a dimerização e ativação do inibidor de kinase NF- κ B (IKKi) e da quinase de ligação do ativador de NF- κ B

associado ao membro da família TRAF (TBK1). Uma vez ativado, o TBK1/IKKi levará à fosforilação do fator de transcrição IRF3, causando sua translocação para o núcleo e consequente transcrição de genes relacionados ao interferon (ARPAIA; BARTON, 2013).

Apesar de já estar bem estabelecido que os TLRs são capazes de reconhecer uma ampla variedade de ligantes encontrados em micro-organismos e no hospedeiro, alguns estudos têm demonstrado a interação entre tais receptores e as lectinas vegetais. Tais lectinas são capazes de modular a resposta imune e produção de citocinas pró-inflamatórias. Visando identificar os mecanismos pelos quais essa imunomodulação ocorre, pesquisas têm correlacionado a ativação de células imunológicas pelo tratamento com as lectinas vegetais à expressão de TLRs. Por exemplo, a lectina KM quando administrada como terapêutico contra leishmaniose foi capaz de induzir a resposta Th-1 a partir da produção de interleucina-12 (IL-12) dependente do reconhecimento de TLR2 (COLTRI *et al.*, 2008).

Em 2007, Sodhi e colaboradores demonstraram que a lectina melhor caracterizada até o momento, concanavalina A (ConA), foi capaz de induzir a expressão de diferentes TLRs em cultura celular de macrófagos murinos. Tal lectina aumentou a expressão *in vitro* dos TLRs (1-9), além de induzir a expressão de citocinas pró-inflamatórias em macrófagos pré-tratados com diferentes ligantes de TLRs. Outro estudo demonstrou que macrófagos peritoneais tratados com a lectina KML-C, de *Viscum album colocatum*, foram capazes de induzir a produção de TNF- α . No entanto, quando essas células foram tratadas com o anticorpo de bloqueio para TLR4, houve a inibição de TNF- α . Tais dados demonstraram que a lectina KLM-C foi capaz de ativar macrófagos que secretam TNF- α através da interação com TLR4 e a ativação de suas vias de sinalização (PARK *et al.*, 2010).

Mariano e colaboradores (2014), avaliaram a interação direta da lectina ArtinM com N-glicanos presentes no TLR2. Eles verificaram que macrófagos obtidos de animais nocaute para TLR2 produziram níveis significativamente mais baixos de IL-12 e IL-10 do que macrófagos de animais naive tratados com ArtinM. Além disso, a ligação dessa lectina com o receptor TLR2 foi notavelmente inibida quando a proteína foi pré-incubada com seu carboidrato específico manotriose. Assim, acredita-se que a ativação de diferentes TLRs por diferentes lectinas vegetais esteja relacionada com os diferentes açúcares específicos de cada lectina, sugerindo que tal interação ocorre

através dos resíduos de carboidratos encontrados em diferentes TLRs (UNITT; HORNIGOLD, 2011).

2.1.4 Uso de lectinas vegetais como adjuvantes vacinais

De maneira geral, na última década, os avanços científicos obtidos na área da biologia molecular e imunologia melhoraram a compreensão de várias doenças levando ao desenvolvimento de vacinas mais efetivas (WALMSLEY *et al.*, 2000). A busca por novas substâncias que atuem como adjuvantes capazes de estimular uma resposta imunológica celular eficaz têm sido uma das contribuições mais importantes para a pesquisa de vacinas.

O termo adjuvante é derivado do latim “adjuvare”, cujo significado é ajudar, sendo utilizado para designar qualquer composto que aumente a imogenicidade intrínseca quando usado em combinação com um antígeno ou modulando a resposta imunológica naturalmente induzida contra o antígeno (LYCKE, 2010). A utilização de substâncias com caráter adjuvante gera uma resposta imune com alta intensidade, de maior duração e conseqüentemente mais rápida, utilizando pequena quantidade de antígeno, podendo assim reduzir os custos na produção de vacinas (RESENDE *et al.*, 2004). Desta forma, espera-se que o adjuvante seja capaz de promover uma intensa e prolongada resposta no sistema imunológico do hospedeiro, prevenindo, assim, a doença (AUDIBERT, 2003).

Lectinas vegetais têm demonstrado propriedade biológica como imunoadjuvantes. Por exemplo, estudo realizado por Yoon e colaboradores (2001) demonstraram o potencial adjuvante humoral e celular da lectina KLM-C isolada da espécie *Viscum album coloratum*. Já Cardoso e colaboradores (2012) verificaram que a lectina ArtinM da espécie *Artocarpus integrifolia* foi capaz de desenvolver atividade adjuvante e imunoestimulatória em modelo de infecção de neosporose, induzindo uma resposta imune do tipo Th1 baseada na resposta imune pró-inflamatória e conferindo proteção após desafio parasitário.

As lectinas vegetais também têm sido descritas como potenciais adjuvantes em vacinas de mucosas, já que podem reconhecer glicanos na superfície de células M, conferindo imunidade contra antígenos administrados via oral (LAVELLE *et al.*, 2001). Por exemplo, a aglutinina da espécie *Ulex europaeus* (UEA-1), uma lectina específica

de fucose, que seletivamente marca células M no intestino de camundongos (CLARK *et al.*, 1995).

O potencial adjuvante de ConBr tem sido avaliado em modelo de vacinação contra infecção por *Leishmania amazonensis*. Tal lectina foi capaz de induzir o recrutamento de células polimorfonucleares e mononucleares (TEIXEIRA *et al.*, 2006). Considerando que o macrófago é a principal célula hospedeira da *Leishmania*, o recrutamento de macrófagos induzido por ConBr foi essencial para o controle desse patógeno intracelular. Até o momento não existem relatos na literatura da lectina CFL sendo utilizada como molécula adjuvante em infecções experimentais.

2.2 O gênero *Salmonella*

O gênero *Salmonella* é composto por espécies que apresentam elevada importância para a saúde pública, pois estão entre os principais patógenos responsáveis por surtos infecciosos em todo o mundo. A gastroenterite é o quadro mais comum associado à infecção por *Salmonella*, seguido por bacteremia e a febre entérica (MAJOVICZ *et al.*, 2010). As síndromes clínicas causadas por *S. enterica* podem ser classificadas em dois grupos: as salmoneloses não-tifóides (NTS, infecção caracterizada como gastroenterite ou enterite) e as salmoneloses tifóides (TS, infecção sistêmica). Dentre os sorotipos TS e NTS destacam-se as espécies *Salmonella enterica* sorotipo Typhi (*S. typhi*), causadora da febre tifoide, e *Salmonella enterica* sorotipo Typhimurium (*S. typhimurium*), agente etiológico de gastroenterites auto-limitantes em vários hospedeiros, respectivamente (GARMORY *et al.*, 2002; McCLELLAND *et al.*, 2001).

Os representantes desse gênero pertencem à família Enterobacteriaceae e se caracterizam como bacilos Gram-negativos e anaeróbios facultativos que estão frequentemente associados ao trato intestinal de animais, como comensais ou patógenos (LAROOCK *et al.*, 2015). Além disso, todas as espécies pertencentes ao gênero *Salmonella* são capazes de fermentar lactose, produzir catalase e sulfeto de hidrogênio, utilizar citrato como única fonte de carbono, hidrolisar a uréia e não são produtoras de oxidase (WINN *et al.*, 2008).

Este gênero está dividido em duas espécies, *Salmonella bongori* e *S. enterica*. Esta última é subdividida em seis subespécies: *S. enterica subsp. enterica*, *S. enterica*

subsp. salamae, *S. enterica subsp. arizonae*, *S. enterica subsp. diarizonae*, *S. enterica subsp. indica*, *S. enterica subsp. houtenae* (POPOFF; LE MINOR, 1997). Dentre tais espécies, os sorotipos não-tifoidais não são restritos ao homem, além de serem a principal causa de surtos de origem alimentar. Dentre os sintomas característicos da gastroenterite estão: vômito, náusea e diarreia.

Após a ingestão de alimentos ou água contaminada por *S. enterica*, a acidez estomacal e a competição com a microflora local são as primeiras barreiras a serem enfrentadas pelo patógeno. Ao chegar no íleo distal e ceco, *S. enterica* inicia sua patogênese, invadindo o epitélio intestinal através das células M e placas de Peyer. Macrófagos e células dendríticas fagocitam as bactérias no lúmen intestinal, o que facilita a sua invasão. Essa habilidade de invasão e absorção da *Salmonella* pelo epitélio é conferida por uma série de genes de virulência codificada pela ilha de patogenicidade do tipo 1 (SPI-1). Através do sistema de secreção do tipo III (T3SS-1) codificado pela SPI-1, proteínas bacterianas extracelulares são injetadas no citosol da célula hospedeira. Tais proteínas induzem o rearranjo do citoesqueleto, facilitando a invasão da *Salmonella* (KINGSLEY; BAUMLER, 2000). Essa invasão resulta na posterior proliferação dos micro-organismos nos tecidos linfoides do intestino, atingindo alvos mais internos.

Espécies NTS induzem uma resposta inflamatória local que resulta na infiltração de leucócitos polimorfonucleares dentro do lúmen intestinal, causando diarreia (JONES *et al.*, 1994). Já os sorotipos TS, associados com infecções sistêmicas, são capazes de se dispersar do trato gastrointestinal para o sangue e linfonodos mesentéricos, sendo fagocitados por macrófagos residentes no fígado, baço e medula óssea (MASTROENI; GRANT, 2011; DUNLAP *et al.*, 1991).

As espécies desse gênero possuem distintos mecanismos de virulência para evitar a resposta imune do hospedeiro. Por exemplo, ao analisar a dinâmica de dispersão e distribuição intracelular de *Salmonella enterica* em macrófagos e células dendríticas, Mastroeni e colaboradores (2009) sugerem que tal espécie é resistente ao ambiente antimicrobiano intracelular e capaz de se dispersar para novos sítios de infecção, onde se desenvolve e evita a resposta imune adaptativa. Assim, os sorotipos associados com doenças sistêmicas podem invadir os macrófagos intestinais e se disseminar através do sistema retículo endotelial antes de serem capturados pelos

macrófagos residentes no baço e fígado (JONES *et al.*, 1994; MASTROENI; GRANT, 2011).

A sobrevivência e proliferação em macrófagos estão relacionadas com a habilidade de *Salmonella* em evitar a atividade microbicida no meio intracelular, já que este patógeno pode prevenir a co-localização de NADPH e a síntese de NO na vesícula que contém a *Salmonella* (SCV). Isso é causado pelo T3SS-2, um importante fator de virulência codificado pela ilha de patogenicidade 2 (SPI-2) (CHAKRAVORTTY *et al.*, 2002; VAZQUEZ-TORRES *et al.*, 2000). A SPI-2 tem função essencial para a patogênese de *Salmonella*, já que está relacionada com a habilidade de sobreviver nas células fagocíticas e replicar-se dentro da SCV.

Visando elucidar os mecanismos de virulência atribuídos à patogênese por *Salmonella*, diversos estudos têm utilizado a espécie *S. Typhimurium* como um modelo de febre tifoide em camundongos, já que tal sorotipo causa uma doença similar a febre tifoide em murinos, com lesões intestinais e extraintestinais semelhantes aquelas observadas em pacientes acometidos pela febre tifóide (MASTROENI; GRANT, 2013; ROLAND *et al.*, 2013). Além disso, este sorotipo tem sido utilizado como modelo inflamatório, sendo capaz de causar choque séptico em animais (LIMA-FILHO *et al.*, 2004).

2.2.1 Resposta imune do hospedeiro contra *Salmonella*

As respostas da imunidade inata (ou natural) e adquirida (ou adaptativa) são componentes da defesa do hospedeiro necessárias para o controle da infecção por *Salmonella*. A imunidade inata, que se refere à primeira linha de defesa do organismo contra os micro-organismos, já existe antes mesmo da infecção se instalar e responde essencialmente da mesma maneira e intensidade às infecções repetidas. Já a imunidade adaptativa é caracterizada pela especificidade, memória e capacidade de resposta com maior intensidade em exposições repetidas ao mesmo patógeno (ABBAS *et al.*, 2012). Tal resposta confere proteção mediada por células e anticorpos, sendo imprescindível para obter uma proteção eficaz contra *Salmonella*, considerando que o mesmo é caracterizado como patógeno intracelular facultativo (MASTROENI *et al.*, 1993).

Em resposta à infecção por *Salmonella*, as células apresentadoras de antígenos (APCs), particularmente os macrófagos e células dendríticas, são componentes essenciais da imunidade inata no combate desses patógenos (WICK *et al.*, 2003; YRLID *et al.*, 2000). Entretanto, patógenos do gênero *Salmonella* são capazes de invadir, sobreviver e se multiplicar dentro de macrófagos murinos (STEELE-MORTIMER *et al.*, 2000). Em resposta à essa infecção, os macrófagos produzem citocinas, tais como: IL-1, IL-6, IL-10, IL-12 e TNF-alfa. Essa última está envolvida na formação de granulomas e regulação da atividade microbicida de macrófagos mediada pelo NADPH oxidase (VAZQUEZ-TORRES *et al.*, 2001).

Kalupahana e colaboradores (2005) avaliaram as mudanças fenotípicas e funcionais das células dendríticas e dos macrófagos em resposta à infecção por *Salmonella*. Como esperado, tal estudo concluiu que os macrófagos são eficazes na fagocitose e morte do patógeno. No entanto, as células dendríticas se apresentaram muito mais eficazes que os macrófagos na apresentação de antígenos às células T CD4+, resultando na produção de citocinas. Tais resultados demonstram que as células dendríticas são essenciais para o início da resposta imune adaptativa contra *Salmonella*.

No que se refere à imunidade adaptativa, a resposta humoral é requerida para a proteção contra infecções causadas por *Salmonella* (MCSORLEY; JENKINS, 2000), já que os anticorpos podem causar a opsonização dos micro-organismos presentes no compartimento extracelular, resultando na fagocitose e morte por macrófagos (UPINGTON *et al.*, 2006). Dentre as diferentes classes de anticorpos descritas, a imunoglobulina G (IgG) é essencial na resposta humoral contra *Salmonella*. A IgG além de ser a molécula mais abundante presente no soro humano, é ainda o anticorpo que predomina no soro de pacientes em áreas endêmicas da febre tifóide (SHAHEM *et al.*, 1995).

Goh e colaboradores (2011), avaliaram a eficiência das diferentes subclasses IgG, utilizando a proteína de superfície OmpA de *Salmonella enterica* na modulação da interação entre a bactéria e os fagócitos humanos. Neste estudo, foi possível verificar que todas as subclasses de IgG foram capazes de melhorar a atividade fagocítica de macrófagos humanos. Entretanto, os melhores resultados foram verificados quando *S. Typhimurium* foi opsonizada com IgG3, seguido por IgG1, IgG4 e IgG2. Tal resultado foi correlacionado com a quantificação intracelular de bactérias

viáveis obtida de células infectadas por *Salmonella*. Segundo os autores, a maior flexibilidade das regiões Fab-Fab e Fab-Fc atribuídas à IgG3 em relação às demais subclasses (ROUX *et al.*, 1997), justificaria os melhores resultados obtidos, já que tal característica seria importante para a ligação com os receptores de Fc presente em macrófagos, o que resultaria na melhora da atividade fagocítica.

De maneira geral, o controle da infecção causada por *Salmonella* nos estágios iniciais é independente de linfócitos T, mas claramente dependente de IFN-gama. Nesse contexto, as células naturais Killers (NK) produzem IFN-gama nos estágios iniciais, uma citocina importante na regulação dos mecanismos microbicidas de macrófagos dependentes da enzima óxido nítrico sintase (iNOS) (MASTROENI *et al.*, 1998; KUPZ *et al.*, 2013). As células T são essenciais para o clareamento bacteriano no estágio final da infecção (KUPZ *et al.*, 2014; NAUCIEL, 1990). Considerando a replicação e disseminação de *Salmonella* no meio intracelular, é de vital importância para o hospedeiro que linfócitos T específicos adquiram suas funções efetoras, contribuindo para a eliminação do patógeno (YRLID *et al.*, 2001).

2.2.2 Febre tifoide

A febre tifoide é uma doença febril causada pela espécie *Salmonella enterica* sorotipo Typhi (*S. Typhi*). Tal doença é transmitida através da ingestão de água ou alimentos contaminados por fezes de pacientes, representando um problema de saúde pública em países com precárias condições sanitárias. Estima-se que a febre tifoide afete anualmente 21,5 milhões de pessoas em todo o mundo (CDC, 2015). No Brasil, a incidência da doença tem diminuído nos últimos anos, estando os maiores índices associados aos Estados localizados nas regiões Norte e Nordeste do país, responsáveis por 2.606 e 2.442 casos (2010 a 2014), respectivamente (BRASIL/MS, 2014).

Dentre os fatores que contribuem para o surgimento da doença, estão principalmente a precariedade do saneamento básico e a falta de água potável e de informação quanto aos cuidados adequados durante a manipulação dos alimentos. Isso sugere que seria possível eliminar a doença através de vacinação e medidas de saúde pública. É importante ressaltar que embora a incidência da febre tifoide tenha

declinado na maioria dos Estados brasileiros, a *S. Typhi* deve ser tratada com atenção, considerando-se a fácil disseminação do patógeno.

A espécie *S. Typhi* é restrita aos humanos e caracterizada como bacilo anaeróbico Gram-negativo, intracelular facultativo e não esporulado (PARRY *et al.*, 2002). Dentre os fatores de virulência presentes nessa espécie, está o antígeno Vi, um componente de grande importância na patogênese da infecção. Tal antígeno recobre a superfície bacteriana, inibindo a ação do sistema complemento, promovendo a resistência contra a fagocitose e mascarando o reconhecimento dos PAMPs pelos PRRs (ROBINS; ROBINS, 1984). Por exemplo, Hirose e colaboradores (1997) avaliaram a influência do antígeno Vi de *S. Typhi* na sobrevivência intracelular em cultura de macrófagos humanos. Eles verificaram que *S. Typhi* portadora do Vi, mascarando o LPS, foi capaz de sobreviver dentro das células e suprimir a produção de TNF- α . Em contrapartida, *S. Typhi* sem a cápsula, expondo o LPS, estimulou os macrófagos a produzirem alta concentração de TNF- α . Além disso, outro estudo demonstrou que a presença do antígeno Vi foi capaz de mascarar o reconhecimento do LPS pelo TLR4, um receptor essencial para o controle de infecção por *Salmonella* (WILSON, *et al.*, 2008; TALBOT, *et al.*, 2009).

Após a ingestão do alimento ou água contaminado pelo patógeno, ocorre a dispersão das bactérias no intestino que, através do sangue, migram para os linfonodos, baço e fígado, onde se multiplicam (KAUR; JAIN, 2012). A falta de infiltrado inflamatório intestinal por neutrófilos na fase aguda da febre tifoide sugere que este sorotipo é capaz de evitar a resposta imune inata e causar a infecção sistêmica característica da febre tifoide (RAFATELLU *et al.*, 2008).

Devido à extrema especificidade ao hospedeiro, a patogênese da febre tifoide é pouco esclarecida, já que o sorotipo *S. Typhi* não induz sintomas da doença em animais de laboratório. Assim, os estudos que visam caracterizar a febre tifoide utilizam a espécie *S. Typhimurium* como modelo para entender a patogênese em humanos e, portanto, investigar estratégias de combate às infecções humanas.

O tratamento contra a febre tifoide em adultos é feito pela administração via oral de fluoroquinolonas (CHINH *et al.*, 2000). Todavia, o surgimento de resistência à essa classe de antibióticos tem se tornado um problema de saúde pública, particularmente nos países em desenvolvimento (ZAKI; KARANDE, 2011). Desta

forma, a vacinação em áreas endêmicas é uma alternativa eficaz na prevenção da doença.

2.2.3 Formulações vacinais contra a febre tifoide

A busca no desenvolvimento de vacinas contra *Salmonella* iniciou-se com uma formulação que conferisse proteção contra a febre tifoide (ALMEIDA *et al.*, 2002). Considerando que os membros pertencentes ao gênero *Salmonella* são patógenos intracelulares facultativos, a produção de uma formulação vacinal que confira proteção eficaz deve ser composta de uma combinação de imunidade humoral e celular, já que a imunidade humoral é utilizada para os patógenos extracelulares e a imunidade celular, mediada pelas células T CD4+ e CD8+, é a requerida para eliminar os patógenos intracelulares (MASTROENI *et al.*, 1993).

Atualmente, quatro opções de vacinas estão licenciadas e disponíveis para o uso contra febre tifoide, são elas: a vacina constituída do antígeno Vi purificado, a vacina Ty21a e outras duas vacinas conjugadas polissacarídicas, uma conjugada à exotoxina de *Pseudomonas aeruginosa* (rEPA) e outra conjugada ao toxóide tetânico (TT). Entretanto, o uso dessas duas últimas está restrito à Índia e China. Outra vacina parenteral havia sido licenciada por Wyethem em 1952, no entanto teve seu uso descontinuado após causar reações sistêmicas e febre (STEINBERG *et al.*, 2004).

A primeira evidência de que o antígeno Vi seria um promissor candidato para o desenvolvimento de uma vacina eficaz contra a febre tifoide ocorreu quando foi detectada a presença de anticorpos anti-Vi polissacarídico no soro de pacientes acometidos pela febre tifoide (FELIX *et al.*, 1935). Assim, em 1994, a vacina baseada no antígeno Vi purificado foi licenciada pela Sanofi-Pasteur. Embora tal vacina seja recomendada para a prevenção contra febre tifoide, o seu sucesso é limitado, considerando que o mecanismo de proteção conferido pela vacina é unicamente mediado por anticorpos (KLUGMAN *et al.*, 1996). Além disso, tal vacina não possui potencial imunogênico em crianças abaixo de 2 anos de idade, já que os mesmos são incapazes de desenvolver uma resposta mediada por anticorpos contra o antígeno polissacarídico Vi. Tal fato representa um sério problema, considerando que esse grupo possui elevada incidência de febre tifoide (SINHA *et al.*, 1999). Além disso, para que o indivíduo se mantenha protegido contra a doença, recomenda-se uma dose reforço da vacina a cada 2 anos (JACKSON *et al.*, 2015).

A vacina Ty21a (Vivotif, PaxVax) foi desenvolvida por Germanier e Furer (1975), sendo administrada pela via oral. Essa vacina não expressa o antígeno Vi e o gene funcional galactose-epimerase (*galE*), sendo fortemente atenuada (CRYS *et al.*, 1989; FAUCHER *et al.*, 2006; MARATHE *et al.*, 2012). Tal vacina está disponível na forma líquida ou em cápsulas. A taxa de proteção de Ty21a foi de 77% por 3 anos e 78% por 5 anos em Santiago no Chile (LEVINE *et al.*, 1999). Além de conferir proteção contra a febre tifoide, estudos têm mostrado que tal vacina é capaz de produzir anticorpos contra antígenos O de *Salmonella*, podendo induzir proteção cruzada em sorotipos não-tifoide de *Salmonella* (NTS) (KANTELE *et al.*, 2012). Apesar de produzir uma resposta imune adequada e eficaz contra a febre tifoide, tal vacina apresenta certas desvantagens. A dose oral requer um alto número de bactérias (10^9) para conferir uma imunidade protetora e uma dose reforço é recomendada a cada 5 anos para manter a imunidade protetora. Além disso, a vacina não é indicada para crianças abaixo de 5-6 anos de idade e indivíduos imunocomprometidos (MARATHE *et al.*, 2012; JACKSON *et al.*, 2015).

A terceira opção é uma vacina de Vi conjugada à exotoxina A recombinante e não tóxica de *Pseudomonas aeruginosa* por administração parenteral que é segura e imunogênica e tem mais de 90% de eficácia em crianças de 2 a 5 anos de idade (LIN *et al.*, 2001). Tal vacina encontra-se licenciada, mas seu uso ainda está restrito à alguns países (SZU, 2013). Outra opção é a vacina do toxóide tetânico conjugado ao antígeno Vi. Tal vacina foi capaz de conferir 100% de proteção contra a febre tifoide em 1765 crianças de 6 meses a 12 anos de idade, demonstrando alto poder imunogênico (MITRA *et al.*, 2016). Vacinas conjugadas apresentam maior eficácia e imunidade, já que possuem o potencial de recrutar células T para a produção de anticorpos contra o antígeno Vi (MICOLI *et al.*, 2011).

Com vistas ao desenvolvimento de novas vacinas mais eficazes contra a febre tifoide, o investimento tem sido crescente nos últimos anos, principalmente por parte dos mercados emergentes, dos institutos para saúde global e parceiros acadêmicos (MACLENNAN *et al.*, 2014). Diante disso, diversas formulações vacinais contra *Salmonella* estão sendo pesquisadas, tais como: proteínas recombinantes, vacinas vivas-atenuadas, proteínas purificadas, tecnologia GMMA (Módulos generalizados para antígenos de membrana), antígeno O glicoconjugado e o antígeno Vi conjugado (MACLENNAN *et al.*, 2014; ROSSI *et al.*, 2012; THIEM *et al.*, 2011).

2.2.3.1 Antígeno vacinal Vi

A espécie *Salmonella* Typhi expressa em sua superfície o antígeno capsular polissacarídico Vi que contribui para a sua virulência. Tal antígeno é um polímero linear de 1, 4(2-deox)-2-N-ácido acetilgalacturônico variável com 60 a 70% de unidades monoméricas O-acetiladas na posição C3 (SZU *et al.*, 1991). Estudos demonstram que esse antígeno tem se apresentado como um promissor antígeno vacinal, produzindo imunidade contra a febre tifoide (PARRY *et al.*, 2002). A vacina atualmente licenciada é administrada via intramuscular, contendo 25 µg do polissacarídeo capsular Vi purificado. Uma única dose dessa vacina confere uma taxa de 72% de proteção após 17 meses e 55% após 3 anos, no Nepal e África do Sul, respectivamente (ACHARYA *et al.*, 1987; KLUGMAN *et al.*, 1987).

A resposta imunológica decorrente da utilização do antígeno Vi é unicamente mediada pela produção de anticorpos IgG e independente de célula T. Particularmente, a subclasse de imunoglobulinas IgG1 é predominante no soro de indivíduos vacinados com o antígeno Vi (BRUGUIER *et al.*, 1993). Tal fato corrobora com o estudo realizado por Goh e colaboradores (2011), onde demonstrou a molécula IgG1 como uma das mais eficientes subclasses de anticorpos em aumentar a atividade fagocítica de *Salmonella* desempenhada por macrófagos.

Marshall e colaboradores (2012) mostraram que células B1b da cavidade peritoneal, mas não outros tipos de células B, são seletivamente induzidas a proliferar e diferenciar em células produtoras de anticorpos em resposta à imunização com o antígeno Vi purificado. Em camundongos, células B1 desempenham um papel essencial em resposta à antígenos que atuam independentemente de células T (MARTIN *et al.*, 2001). Dois tipos de células B1 são encontradas em camundongos, B1a e B1b, embora os dois tipos celulares sejam geralmente encontrados na cavidade peritoneal, eles podem estar presentes no baço (STALL *et al.*, 1992).

Embora o antígeno polissacarídico Vi de *S. Typhi* Vi e formulações contendo Vi sejam utilizados como vacinas na prevenção contra a febre tifoide (KLUGMAN *et al.*, 1987), tal antígeno apresenta algumas desvantagens. O Vi pode diminuir a estimulação da resposta imune inata, o recrutamento de leucócitos e a produção de citocinas inflamatórias (WILSON *et al.*, 2011). Além disso, esse antígeno ainda é um potente inibidor da resposta mediada por células T (SRIKANTH *et al.*, 2014). Tal fato limita a eficácia da proteção pelo antígeno Vi, considerando que células T e as

citocinas produzidas por elas, tais como IFN-gama, são necessárias para o clareamento bacteriano e imunidade a longo prazo contra *Salmonella* (HESS *et al.*, 1996; LALMANACH; LANTIER, 1999; PIE *et al.*, 1997; MONACK *et al.*, 2004).

Jansen e colaboradores (2011) demonstraram que a expressão do antígeno Vi por uma cepa quimérica genômica de *S. Typhimurium*/*S. Typhi* foi correlacionada com a indução da citocina anti-inflamatória IL-10 por macrófagos, células dendríticas e células NK em esplenócitos murinos. Tal fato representa outra desvantagem para a vacina baseada no antígeno Vi, já que a produção da citocina IL-10 pode suprimir a resposta bactericida de macrófagos contra *Salmonella* (LEE *et al.*, 2011). Além disso, a expressão do antígeno Vi em *S. Typhimurium* resulta na redução da produção das citocinas interleucina-6 (IL-6) e do fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α) devido à inibição do seu reconhecimento pelo receptor TLR4 em macrófagos murinos derivados da medula óssea (WILSON *et al.*, 2008). Tal receptor tem papel essencial na defesa do hospedeiro contra *Salmonella*, resultando na produção de citocinas e morte da bactéria por macrófagos murinos (WEISS *et al.*, 2004).

A vacina baseada no antígeno Vi purificado possui o tempo de memória imunológica limitado, sendo recomendada nova imunização a cada 2 anos (FDA, 2015). Além disso, a vacina baseada no antígeno Vi purificado não confere proteção em crianças menores de 2 anos, já que não produzem anticorpos em quantidades adequadas e são incapazes de produzir uma resposta eficaz contra antígenos polissacarídicos. Somente a partir de 2 ou 3 anos de idade, as crianças adquirem a capacidade de responder a esse tipo de antígeno, ficando susceptíveis à infecções. Tal fato representa um sério problema, considerando que esse grupo apresenta alta incidência da febre tifoide (SINHA *et al.*, 1999).

Visando desenvolver uma geração de vacinas com maior eficácia contra a febre tifoide, novos conjugados têm sido pesquisados a fim de melhorar a resposta imunológica induzida pelo antígeno Vi, tais como a proteína da toxina do tétano (TT), toxóide da difteria (DT), uma forma recombinante não-tóxica da toxina da difteria (CRM₁₉₇), bem como a proteína recombinante rEPA (CUI *et al.*, 2010; MICOLI *et al.*, 2011; MOHAN *et al.*, 2015; THIEM *et al.*, 2011). Tais formulações têm apresentado resultados promissores, demonstrando resposta mais eficaz que o antígeno Vi administrado isoladamente. Apesar de induzirem uma resposta mediada por células T e apresentarem bons resultados, os novos conjugados ao Vi não conferem proteção

contra doenças causadas por outras espécies de *Salmonella* não-tifoídes. Atualmente, as formulações vacinais constituídas pelos conjugados rEPA e TT estão licenciadas para uso restrito na Índia e China (MACLENNAN *et al.*, 2014). Nesse âmbito, até o momento não existem relatos de estudos co-administrando lectinas vegetais como potencializadores da resposta do antígeno Vi contra a febre tifoide.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A. K. *et al.* **Imunologia celular e molecular**. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012.

ACHARYA, I.L. *et al.* Prevention of typhoid fever in Nepal with the Vi capsular polysaccharide of *Salmonella typhi*. A preliminary report. **N Engl J Med.**, vol. 317, p. 1101-1104, 1987.

AFOLABI-BALOGUN, N.B. *et al.* Isolation and characterization of a mannose-binding insecticidal lectin gene from *Allium sativum* (garlic) and its putative role in insect resistance using bioinformatics tools. **Infect Genet Evol.**, vol. 12, p. 1508- 1512, 2012.

AINOUZ, I.L.; SAMPAIO, A.H. Screening of Brazilian marine algae for hemagglutinins. **Bot Marina**, vol. 34, p. 211-214, 1991.

AKIRA, S., *et al.* Pathogen recognition and innate immunity. **Cell**, vol. 124, p. 783–801, 2006.

ALMEIDA, M. E. S. *et al.* *Salmonella* vacinais. **Biotecnol. Ci. Desenvol.**, vol. 25, p. 22-26, 2002.

ANDRADE, J.L. *et al.* Lectin-Induced Nitric Oxide Production. **Cell Immunol.**, vol. 194, p. 98-102, 1999.

ARPAIA, N., BARTON, G.M. The impact of toll-like receptors on bacterial virulence strategies. **Curr Opin Microbiol**, vol. 16, p. 17-22, 2013.

ASSREUY, A.M.S. *et al.* Vasodilator effects of Diocleinae lectins from the *Canavalia* genus. **Naunyn-Schmied Arch Pharmacol.**, vol.380, p. 509-521, 2009.

ASSREUY, A.M.S. *et al.* Anti-inflammatory effect of glucose-mannose binding lectins isolated from Brazilian beans. **Mediat Inflamm**, vol. 6, p. 201-210, 1997.

AUDIBERT, F. Adjuvants for vaccines, a quest. **Internat. Immunopharmacol.**, vol. 3, p. 1187-1193, 2003.

- BARAUNA, S.C. *et al.* Antidepressant-like effect of lectin from *Canavalia brasiliensis* (ConBr) administered centrally in mice. **Pharmacol, Bioch Behavior**, vol. 85, p. 160–169, 2006.
- BARBOSA, T. *et al.* In vivo lymphocyte activation and apoptosis by lectins of the Diocleinae subtribe. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, vol. 96, p.673-678, 2001.
- BARRAL-NETO, M. *et al.* Human lymphocyte stimulation by legume lectins from the Diocleae tribe. **Immunol Invest.**, vol. 21, p. 297-303, 1992.
- BECKER, C.E.; O'NEIL, L.A.J. Inflammasomes in inflammatory disorders: the role of TLRs and their interactions with NLRs. **Semin Immunopathol**, vol.29, p. 239-248, 2007.
- BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014. Situação epidemiológica, disponível no endereço: <http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2014/julho/30/Febre-Tifoide---Planilha-Casos-Febre-Tifoide---Brasil.pdf>. Acessado em: 13/05/16.
- BRUGIER, J.C., *et al.* Subclasses of human vaccinal antibodies to the Vi capsular polysaccharide of *Salmonella typhi*. **Int J Clin Lab Res**, vol. 23, p. 38-41, 1993.
- CALVETE, J.J. *et al.* Molecular characterization and crystallization of Diocleinae lectins. **Bioch et Biophys Acta**, vol. 1430, p. 367–375, 1999.
- CARDOSO, M.R.D. *et al.* Adjuvant and immunostimulatory effects of a D-galactose-binding lectin from *Synadenium carinatum* latex (ScLL) in the mouse model of vaccination against neosporosis. **Vet Res.**, p. 43-76, 2012.
- CARVALHO, C.P.S. *et al.* Expression of the *Canavalia brasiliensis* Lectin (ConBr) in Tobacco Plant. **Protein Pept Lett.**, vol. 13, p. 1045-1049, 2006.
- CAVADA, B.S.*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. **Curr. Protein. Pept. Sci.**, vol. 2, p.123–135, 2001.
- CENTER FOR DISEASE CONTROL. **Typhoid Fever, 2015.** In: http://www.cdc.gov/nczved/divisions/dfbmd/diseases/typhoid_fever. Accessed: 13 May 2016.

CHAKRAVORTTY, D. *et al.* *Salmonella* pathogenicity island 2 mediates protection of intracellular *Salmonella* from reactive nitrogen intermediates. **J Exp Med.**, vol. 195, p. 1155-1166, 2002.

CHAN, Y.S. *et al.* Isolation of a Glucosamine Binding Leguminous Lectin with Mitogenic Activity towards Splenocytes and Anti Proliferative Activity towards Tumor Cells. **Plos One**, Vol. 7, p. e38961, 2012.

CHARUNGCHITRAK, S. *et al.* Antifungal and antibacterial activities of lectin from seeds of *Archidendron jiringa* Nielsen. **Food chem.**, vol. 125, p. 1025-1032, 2011.

CHINH, N.T. *et al.* A randomised controlled comparison of azithromycin and ofloxacin for multidrug-resistant and nalidixic acid resistant enteric fever. **Antimicrob Agents Ch**, vol. 44, p. 1855-1859, 2000.

CLARK, M.A. *et al.* Selective binding and transcytosis of *Ulex europaeus* 1 lectin by mouse Peyer's patch M-cells in vivo. **Cell Tissue Res.**, vol. 282, p. 455-61, 1995.

COLTRI, K.C. *et al.* Therapeutic administration of KM+ lectin protects mice against *Paracoccidioides brasiliensis* infection via interleukin-12 production in a toll-like receptor 2-dependent mechanism. **Am J Pathol**, vol.173, p. 423-432, 2008.

CRUZ, M.S.D. *et al.* Factors affecting germination of *Canavalia brasiliensis*, *Leucaena leucocephala*, *Clitoria ternatea* and *Calopogonium mucunoides* seeds. **Seed Science Technol**, vol. 23, p. 447-454, 1995.

CRYZ, S. J. *et al.* Construction and characterization of a Vi-positive variant of the *Salmonella Typhi* live oral vaccine strain Ty21a. **Infect. Immun**, vol. 57, p. 3863–3868, 1989.

CUI, C. *et al.* Physical and chemical characterization and immunologic properties of *Salmonella enterica* serovar typhi capsular polysaccharide diphtheria toxoid conjugates. **Clin Vaccine Immunol.**, vol. 17, p. 73-79, 2010.

DAM, T.K. *et al.* Thermodynamic Binding Studies of Lectins from the Diocleinae subtribe to deoxy analogs of the core trimannoside of asparagine-linked oligosaccharides. **J. Biol. Chem**, vol. 275, n. 21, p. 16119-16126. 2000.

DELBAERE, L.T.J. *et al.* Molecular recognition of a human blood group determinant by a plant lectin. **Can. J. Chem**, vol. 68, p. 1116, 1990.

DEREWENDA, Z. *et al.* The structure of the saccharide-binding site of concanavalin A. **EMBO J**, vol. 8, p. 2189-2193, 1989.

DIAZ, P.H. *et al.* Aplicaciones de las lectinas. **Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter**, vol. 15, p. 91-95, 1999.

DOWLING, J.K.; DELLACASAGRANDE, J. Toll-Like Receptors: Ligands, Cell-Based Models, and Readouts for Receptor Action. **Methods Mol Biol.**, vol. 1390, p. 3-27, 2016,.;1390:3-27.

DUNLAP, N.E. *et al.* A 'safe-site' for *Salmonella* Typhimurium is within splenic cells during the early phase of infection in mice. **Microb Path.**, vol. 10, p. 297-310, 1991.

FAHEINA-MARTINS, G.V. *et al.* Antiproliferative effects of lectins from *Canavalia ensiformis* and *Canavalia brasiliensis* in human leukemia cell lines. **Toxicol In Vitro**, vol. 26, p. 1161-1169, 2012.

FAUCHER S. P. *et al.* Transcriptome of *Salmonella enterica* serovar Typhi within macrophages revealed through the selective capture of transcribed sequences. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, vol. 103, p. 1906-1911, 2006.

FDA. Typhim Vi Polysaccharide Vaccine. Disponible em: <http://www.fda.gov/downloads/BiologicsBloodVaccines/Vaccines/ApprovedProducts/UCM142811.pdf>

FELIX, A. *et al.* The Occurrence of Typhoid Bacilli Containing Vi Antigen in Cases of Typhoid Fever and of Vi Antibody in their Sera. **J Hyg**, vol. 35, p. 421-427, 1935.

FU, L. *et al.* Plant lectins: Targeting programmed cell death pathways as antitumor antigens. **Int J Biochem Cell B.**, vol. 43, p. 1442-1449, 2011.

GARMORY, H. *et al.* *Salmonella* vaccines for use in humans: present and future perspectives. **FEMS Microbiol. Rev.**, vol. 26, p.339-353, 2002.

GERMANIER, R.; FURER, E. Isolation and characterization of gal E mutant Ty21a of *Salmonella typhi*: a candidate strain for a live oral typhoid vaccine. **J Infect Dis.**, vol. 141, p. 553-8, 1975.

GRANGEIRO, T.B. **Clonagem, seqüenciamento e expressão do gene da lectina (ConBr) de semente da *Canavalia brasiliensis***. Tese (Doutorado em Bioquímica). – Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 1996.

GRANGEIRO, T.B. *et al.* Molecular cloning and characterization of ConBr, the lectin of *Canavalia brasiliensis* seeds. **Eur J Biochem.**, vol. 248, p. 41-48, 1997.

GOG, J.R. *et al.* Dynamics of *Salmonella* infection of macrophages at the single cell level. **J. R. Soc. Interface**, doi:10.1098/rsif.2012.0163, 2012.

GOH, Y.S., *et al.* Human IgG isotypes and activating Fcγ receptors in the interaction of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium with phagocytic cells. **Immunol.**, vol. 133, p. 74–83, 2011.

GOLDSTEIN, I.J. *et al.* What should be called a lectin? **Nature**, vol. 285, p. 66, 1980.

GOMES, J.C. *et al.* Histamine release induced by glucose (mannose)- specific lectins isolated from Brazilian beans. Comparasion with concanavalin A. **Agents Actions**, vol. 41, p. 132-135, 1994.

GUZMAN, C.A. *et al.* Vaccines against typhoid fever. **Vaccine**, vol. 24, p. 3804-3811, 2006.

HANCOCK, R. E. *et al.* Modulating immunity as a therapy for bacterial infections. **Nat. Rev. Microbiol.** vol. 10, p. 243-254, 2012.

HAVT, A. *et al.* The effect of *Cratylia floribunda* lectin on renal hemodynamics and ion transport. **Brazilian J Pharm Sciences** vol. 51, p 755-761, 2015.

HESS, J. *et al.* *Salmonella* Typhimurium aroA- infection in gene-targeted immunodeficient mice: Major role for CD4+ TCR $\alpha\beta$ cells and IFN- γ in bacterial clearance independent of intracellular location. **J Immunol**, vol. 156, p. 3321-3326, 1996.

HIROSE, K. *et al.* Survival of Vi-capsulated and Vi-deleted *Salmonella* typhi strains in cultured macrophage expressing different levels of CD14 antigen. **FEMS Microbiol Lett.**, vol. 147, p. 259-265, 1997.

HONG, B. *et al.* A super TLR agonist to improve efficacy of dendritic cell vaccine in induction of anti-HCV immunity. **PLoS ONE**. vol. 7, p. e48614, 2012.

JACQUES, A.V. *et al.* Lectin from *Canavalia brasiliensis* (ConBr) protects hippocampal slices against glutamate neurotoxicity in a manner dependent of PI3K/Akt pathway. **Neuroch Internat**, vol.62, p.836–842, 2013.

JACKSON, B.R. *et al.* Updated Recommendations for the Use of Typhoid Vaccine — Advisory Committee on Immunization Practices, United States, 2015. **MMWR**, vol. 64, p. 305-308, 2015.

JANEWAY, C. A. Jr. Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. Cold Spring Harb. Symp. **Quant. Biol.**, vol. 54, p. 1–13, 1989.

JANEWAY, C.A. Jr. A trip through my life an immunological theme. **Annu. Rev. Immunol.**, vol. 20, p. 1-28, 2002.

JANSEN, A.M. *et al.* A *Salmonella* Typhimurium-Typhi Genomic Chimera: A Model to Study Vi Polysaccharide Capsule Function *In Vivo*. **PLoS Pathog**, vol. 7, p.e1002131, 2011.

JIN, M. S.; LEE, J. O. Structures of the toll-like receptor family and its ligand complexes. **Immunity**, vol. 29, p. 182–191, 2008.

JIMENEZ, P. *et al.* Effects of short-term heating on total polyphenols, anthocyanins, antioxidant activity and lectins of different parts of dwarf elder (*Sambucus ebulus* L.). **Plant Foods Hum Nutr.**, vol. 69, p. 168-174, 2014.

JONES, B. D. *et al.* *Salmonella* Typhimurium initiates murine infection by penetrating and destroying the specialized epithelial M cells of the Peyer's patches. **J. Exp. Med.**, vol. 180, p. 15-23, 1994.

KALUPAHANA, R.S. *et al.* Activation of murine dendritic cells and macrophages induced by *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. **Immunol**, vol. 115, p. 462–472, 2005.

KANTELE, A. *et al.* Live oral typhoid vaccine *Salmonella* Typhi Ty21a – A surrogate vaccine against non-typhoid *Salmonella*? **Vaccine**, vol. 30, p. 7238-7245, 2012.

KAUR, J.; JAIN, S.K. Role of antigens and virulence factors of *Salmonella enterica* serovar Typhi in its Pathogenesis. **Microbiol Res**, vol. 167, p. 199- 210, 2012.

KAUR, N. *et al.* Two novel lectins from *Parkia biglanduloda* and *Parkia roxburghii*: isolation, physicochemical characterization, mitogenicity and anti-proliferative activity. **Protein Pept Lett.**, vol. 12, p. 585-595, 2005.

KEITEL, W.A. *et al.* Clinical and serological responses following primary and booster immunization with *Salmonella typhi* Vi capsular polysaccharide vaccines. **Vaccine**, vol. 12, p. 195-199, 1994.

KIDD, P. Th1/Th2 balance: the hypothesis, its limitations, and implications for health and disease. **Altern Med Rev.**, vol. 8, p. 223-246, 2003.

KINGSLEY, R.A.; BAUMLER, A.J. Host adaptation and the emergence of infectious disease: *the Salmonella* paradigm. **Mol Microbiol**, vol. 36, p. 1006-1014, 2000.

KLUGMAN, K.P. *et al.* Immunogenicity, efficacy and serological correlate of protection of *Salmonella typhi* Vi capsular polysaccharide vaccine three years after immunization. **Vaccine**, vol. 14, p. 435-438, 1996.

KLUGMAM, K. *et al.* Protective activity of Vi polysaccharide vaccine against typhoid fever. **Lancet**, vol. 2, p. 1165-1169, 1987.

KUMAR H, *et al.* Pathogen recognition in the innate immune response. **Biochem J.**, vol. 420, p. 1-16, 2009.

KUPZ, A. *et al.* Contribution of Thy1+ NK cells to protective IFN- γ production during *Salmonella typhimurium* infections. **Proc Natl Acad Sci**, vol. 110, p. 2252-2257, 2013.

KUPZ, A. *et al.* Cellular Requirements for Systemic Control of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Infections in Mice. **Infect Immun**, vol. 82, p. 4997-5004, 2014.

LALMANACH, A.C.; LANTIER, F. Host cytokine response and resistance to *Salmonella* infection. **Microbes Infect**, vol. 1, p. 719-726, 1999.

LAM, S.K.; NG, T.B. Lectins: production and practical applications. **Appl Microbiol Biotechnol**, vol. 89, p. 45-55, 2011.

LAROCK, D.L. *et al.* Salmonellae interactions with host processes. **Nat Rev.**, vol. 13, p. 191-205, 2015.

LAVALLE, E.C. *et al.* The identification of plant lectins with mucosal activity. **Immunol.**, vol. 102, p. 77-86, 2001.

LEE, KS *et al.* IL-10 suppresses bactericidal response of macrophages against *Salmonella Typhimurium*. **J Microbiol.**, vol. 6, p. 1050-1053, 2011.

LEMAITRE, B., *et al.* The dorsoventral regulatory gene cassette *spätzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. **Cell**, vol. 86, p. 973–983, 1996.

LEVINE, M.M. *et al.* Duration of efficacy of Ty21a, attenuated *Salmonella typhi* live oral vaccine. **Vaccine.**, vol. 2, p. 22-27, 1999.

LEWIS, G.; *et al.* Legumes of the world. **Kew, Royal Bot. Gardens**, p. 577, 2005.

LIMA-FILHO, J.V.M. *et al.* Effect of the *Escherichia coli* EMO strain on experimental infection by *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in gnotobiotic mice. **Bras. J. Med. Biological Research**, vol. 37, p. 1005-1013, 2004.

LIN, F.Y. *et al.* The efficacy of a *Salmonella typhi* Vi conjugate vaccine in two-to-five-year-old children. **N Engl J Med.**, vol. 344, p. 1263-1269, 2001.

- LYCKE, N. Is the choice of vaccines adjuvant critical for long-term memory development? **Expert. Rev. Vaccines.**, vol. 9, p.1357-1361, 2010.
- MACIEL, M. I. S. *et al.* *Anacardium occidentale* bark lectin: purification, immobilization as an affinity model and influence in the uptake of Technetium-99M by rat adipocytes. **Appl Bioch Biotechnol**, v. 168, p. 580-591, 2012.
- MACLENNAN, C.A. Antibodies and protection against invasive *Salmonella* disease. **Front Immunol.**, vol.5, 635, p. 1-4, 2014.
- MACLENNAN, C.A. *et al.* Vaccines against invasive *Salmonella* disease Current status and future directions. **Hum Vaccin Immunother.**, vol.10, p. 1478-1493, 2014.
- MAISONNEUVE, C., *et al.* Unleashing the potential of NOD- and Toll-like agonists as vaccine adjuvants. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, vol. 111, p. 12294-12299, 2014.
- MAJEE, S.B.; BISWAS, G.R. Exploring plant lectins in diagnosis, prophylaxis and therapy. **J Med Plant Res**, vol. 7, p. 3444- 3451, 2013.
- MAJOWICZ, S.E. *et al.* The global burden of nontyphoidal *Salmonella* gastroenteritis. *Clin Infect Dis.*, vol. 50, p. 882–889, 2010.
- MARTIN, F. *et al.* Marginal zone and B1 B cells unite in the early response against T-independent blood-borne particulate antigens. **Immunity**, vol. 14, p. 617–629, 2001.
- MASTROENI, P. *et al.* Role of T cells, TNF alpha and IFN gamma in recall of immunity to oral challenge with virulent salmonellae in mice vaccinated with live attenuated aro-*Salmonella* vaccines. **Microb. Pathog**, vol.13, p. 477-491, 1992.
- MASTROENI, P. *et al.* Adoptive Transfer of Immunity to Oral Challenge with Virulent Salmonellae in Innately Susceptible BALB/c Mice Requires Both Immune Serum and T Cells. **Infect Immun.**, vol.61, p. 3981-3984, 1993.
- MASTROENI, P., *et al.* Interleukin-12 is required for control of the growth of attenuated aromatic-compounddependent salmonellae in BALB/c mice: role of gamma interferon and macrophage activation. **Infect Immun**, vol. 66, p. 4767–4776, 1998.
- MASTROENI, P. *et al.* A dynamic view of the spread and intracellular distribution of *Salmonella enterica*. **Nature Rev Microbiol** vol. 7, p. 73-80, 2009.

MASTROENI, P.; GRANT, A.J. Spread of *Salmonella enterica* in the body during systemic infection: Unravelling host and pathogen determinants. **Expert Rev Mol Med**, vol. 13, p.e12, 2011.

MASTROENI, P; GRANT, A. Dynamics of spread of *Salmonella enterica* in the systemic compartment. **Microbes Infect.**, vol. 15, p. 849-857, 2013.

McCLELLAND, M. *et al.* Complete genome sequence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LT2. **Nature**, vol. 413, p.852-856, 2001.

MCSORLEY, S. J.; JENKINS, M. K. Antibody is required for protection against virulent but not attenuated *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. **Infect Immun**, vol. 68, p. 3344-3348, 2000.

MEDZHITOV R. Recognition of microorganisms and activation of the immune response. **Nature**, vol. 449, p. 819-826, 2007.

MICOLI, F. *et al.* Vi-CRM197 as a new conjugate vaccine against *Salmonella Typhi*. **Vaccine**, vol. 29, p. 712-720, 2011.

MITRA, M. *et al.* Efficacy and safety of vi-tetanus toxoid conjugated typhoid vaccine (PedaTyph™) in Indian children: School based cluster randomized study. **Hum Vaccin Immunother.**, vol. 12, p. 939-945, 2016.

MOHAN, V.K. *et al.* Safety and immunogenicity of a Vi polysaccharide-tetanus toxoid conjugate vaccine (Typbar-TCV) in healthy infants, children, and adults in typhoid endemic areas: a multicenter, 2-cohort, open-label, double-blind, randomized controlled phase 3 study. **Clin Infect Dis.**, vol. 61, p. 393-402, 2015.

MOLINA, M.C.; VINCENTE, C. Correlations between enzymatic activity of lectins, putrescine content and chloroplast damage in *Xanthoria parietina*. **Cell. Adhes. Commun**, vol. 3, p.1-12, 1995.

MONACK, D.M. *et al.* *Salmonella typhimurium* persists within macrophages in the mesenteric lymph nodes of chronically infected Nrp1^{1+/+} mice and can be reactivated by IFN gamma neutralization. **J Exp Med**, vol. 199, p. 231-241, 2004.

MOON, J. J. *et al.* Enhancing humoral responses to a malaria antigen with nanoparticle vaccines that expand Tfh cells and promote germinal center induction. **PNAS**, vol. 109, p. 1080–1085, 2012.

MOREIRA, R.A.; CAVADA, B.S. Lectins from *Canavalia brasiliensis* (Mart.) Isolation, characterization and behavior during germination. *Biologia Plantarum*, vol. 26, p. 113-120. 1984.

MURAILLE, E. *et al.* Carbohydrate-bearing cell surface receptors involved in innate immunity: interleukin-12 induction by mitogenic and nonmitogenic lectins. **Cell. Immunol.**, vol. 191, p. 1-9, 1999.

NAUCIEL, C. Role of CD4+ T cells and T-independent mechanisms in acquired resistance to *Salmonella typhimurium* infection. **J Immunol.**, vol. 145, p. 1265-1269, 1990.

NAVARRO, Y; PEREZ, G.G. Comparasion de algunas propiedades de las lectinas de semilla y de raiz de haba (*Vicia Faba*). **Rev Colombiana Química**, vol. 19, p. 35-50, 1990.

O'NEILL, L.A.J., *et al.* The history of Toll-like receptors — redefining innate immunity. **Nature Rev.**, vol. 13, p. 453-460, 2013.

OLIVEIRA, J.T. *et al.* Isolation and partial characterization of a lectin from *Cratylia floribunda* Mart seeds. **Ver. Bras. Bot.**, vol.14, p. 61-66, 1991.

ONWUEZOBE, I.A. *et al.* Antimicrobials for treating symptomatic non-typhoidal *Salmonella* infection. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, Art. No.: CD001167. DOI: 10.1002/14651858.CD001167.pub2, 2012.

PEUMANS, W.J.; VAN DAMME, E.J.M. Lectins as plant defense proteins. **Plant Physiol.**, vol. 109, p. 347-352, 1995.

PACHECO, L.G.C. *et al.* *Salmonella* como vetor de vacinas orais. **R. Ci. Med. biol.**, vol. 3, p. 115-123, 2004.

PARK, H-J., *et al.* TLR4-mediated activation of mouse macrophages by Korean mistletoe lectin-C (KML-C). **Biochem Biophys Res Commun.**, vol. 396, p. 721-725, 2010.

PARRY, C.M. *et al.* Typhoid fever. **N Engl J Med**, vol. 347, p. 1770-1782, 2002.

PIE, S. *et al.* Th1 response in *Salmonella typhimurium*-infected mice with a high or low rate of bacterial clearance. **Infect Immun**, vol. 65, p. 4509-4514, 1997.

PIRES, A.F. *et al.* Opioid-like antinociceptive effects of oral administration of a lectin purified from the seeds of *Canavalia brasiliensis*. **Fundam Clin Pharmacol.**, vol. 27, p.201-209, 2013.

POLHILL, R.M. Classification of the Leguminosae, 1994. Em: BISBY, F.A. *et al.* (Eds.), Phytochemical Dictionary of the Leguminosae. **Chapman & Hall**, New York, p. 45–47.

POPOFF, M.Y.; LE MINOR, L. Taxonomy of the genus *Salmonella*. Changes in serovars nomenclature. *In*: M.Y. POPOFF; L. LE MINOR: Antigenic formulas of the *Salmonella* serovars, 7th revision. **WHO Collaborating Centre for Reference and Research on Salmonella**. Institut Pasteur, Paris, p. 5, 1997.

QUEIROZ, L.P. *Canavalia* in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <http://reflora.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB22855>. Acesso em: 13 Maio, 2016a.

QUEIROZ, L.P. *Cratylia* in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <http://reflora.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB22901>. Acesso em: 13 Maio, 2016b.

RAFATELLU, M. *et al.* Clinical pathogenesis of typhoid fever. **J Infect Developing Countries**, vol. 2, p. 260-266, 2008.

RAMOS, M.V. *et al.* Interaction of Diocleinae lectins with glycoproteins based in surface plasmon resonance. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 2, p. 275-279, 2002.

RAMOS, S.A.F. *et al.* Endophytic microorganisms from *Bauhinia monandra* leaves: Isolation, antimicrobial activities and interaction with galactose-specific lectin BmoLL. **African J Microbiol Res**, vol. 10, p. 600-607, 2016.

RESENDE, F. C. B. *et al.* Adjuvantes de vacinas: possibilidades de uso em seres humanos ou animais. **Rev. Bras Aler Immunopatol.**, vol. .27, p. 116-124, 2004.

ROBBINS J. D.; ROBBINS J. B. Reexamination of the protective role of the capsular polysaccharide (Vi antigen) of *Salmonella typhi*. **J. Infect. Dis.**, vol. 150, p. 436–449, 1984.

RODRIGUEZ, D. *et al.* Differences in macrophage stimulation and leukocyte accumulation in response to intraperitoneal administration of glucose/mannose-binding plant lectins. **Braz J Med Biol Res.**, vol. 25, p. 823-826, 1992.

ROGERIO, A.P. *et al.* Anti-asthmatic potential of a D-galactosebinding lectin from *Synadenium carinatum* latex. **Glycobiol**, vol.17, p. 795–804, 2007.

ROLAND, K.L. *et al.* Salmonella as a vaccine delivery vehicle. **Expert Rev Vaccines.**, vol. 12, p. 1033-1045, 2013.

ROMAGNANI, S. Th1/Th2 cells. **Inflamm Bowel Dis.**,vol.4, p. 285-294, 1999.

ROSSI, O. *et al.* Toll-Like receptor activation by generalized modules for membrane antigens from lipid A mutants of *Salmonella enterica* Serovars Typhimurium and Enteritidis. **Clin Vaccine Immunol.**, vol. 23, p. 304-314, 2016.

ROUX, K.H., *et al.* Flexibility of human IgG subclasses. *J Immunol*, vol. 159, p. 3372-3382, 1997.

RUSSI, M.A.*et al.* ConBr, a Lectin from *Canavalia brasiliensis* Seeds, Protects Against Quinolinic Acid-Induced Seizures in Mice. **Neuchem Res.**, vol. 37, p. 288-297, 2012.

SHAHEEN, H.I., *et al.* Evaluation of the response of human humoral antibodies to *Salmonella typhi* lipopolysaccharide in an area of endemic typhoid fever. **Clin Infect Dis**, vol. 21, p. 1012-1013,1995.

SANTI-GADELHA, T. *et al.* Purification and biological effects of *Araucaria angustifolia* (Araucariaceae) seed lectin. **Bioch. Biophys. Res. Communicat.**, vol.350, p. 1050-1055, 2006.

SANZ-APARICIO, J. *et al.* The crystal structure of *Canavalia brasiliensis* lectin suggests a correlation between its quaternary conformation and its distinct biological properties from Concanavalin A. **FEBS Letters**, vol. 405, p.114–118, 1997.

SHAHEEN, H.I., *et al.* Evaluation of the response of human humoral antibodies to *Salmonella typhi* lipopolysaccharide in an area of endemic typhoid fever. **Clin Infect Dis**, vol. 21, p. 1012-1013, 1995.

SHIMOKAWA, M. *et al.* Two carbohydrate recognizing domains from *Cycas revoluta* leaf lectin show the distinct sugar-binding specificity-A unique mannoooligosaccharide recognition by N-terminal domain. **J Biochem**, doi: 10.1093/jb/mvw011, 2016.

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. **Inter Immunopathol**, vol. 31, p. 233-238, 2016.

SILVA, L.C.M.; CORREIA, M.T.S. Plant lectins and Toll-like receptors: implications for therapy of microbial infections. **Frontiers in Microbiol**, vol. 5, p. 1-3, 2014.

SILVA, F.O. *et al.* Immunostimulatory activity of ConBr: a focus on splenocyte proliferation and proliferative cytokine secretion. **Cell Tissue Res.**, vol. 346, p. 237-244, 2011.

SILVA, L.M.C.M. *et al.* Antinociceptive and Anti-inflammatory Activities of Lectin from Marine Red Alga *Pterocladia capillacea*. **Biol Pharm Bull.**, vol. 33, p. 830-835, 2010.

SILVA, F.O. *et al.* Perfil de proteases de lesões cutâneas experimentais em camundongos tratadas com a lectina isolada das sementes de *Canavalia brasiliensis*. **Ciência Rural**, vol.39, p. 1808-1814, 2009.

SINHA, A. *et al.* Typhoid fever in children aged less than 5 years. **The Lancet**, vol. 354, p. 734-737, 1999.

SODHI, A., *et al.* Concanavalin A induced expression. Of Toll- like receptors in murine peritoneal macrophages *in vitro*. **Inter.immunopharmacol.**, vol. 7, p. 454–463, 2007.

SOUZA, M.A. *et al.* The immunomodulatory effect of plant lectins: a review with emphasis on ArtinM properties. **Glycoconj J.**, vol. 30, p. 641-657, 2013.

SRIKANT, K.S. *et al.* The Virulence polysaccharide Vi released by *Salmonella* Typhi targets membrane prohibitin to inhibit T cell activation. **J Infect Dis**, online, 2014.

SUSEELAN, K. N. *et al.* Purification and characterization of a lectin from wildsunflower (*Helianthus tuberosus* L.) tubers. **Arch. Biochem. Biophysics.**, vol. 407, p. 241-247, 2002.

SUMNER, J.B; HOWELL, S.F. Identification of hemagglutinin of Jack Bean with Concanavalin A. **J Bacteriol**, vol. 32, p. 227-237, 1936.

STALL, A. M. *et al.* Characteristics and development of the murine B-1b (Ly-1 B sister) cell population. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, vol. 651, p. 33–43, 1992.

STEELE-MORTIMER, O. *et al.* Vacuole acidification is not required for survival of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium within cultured macrophages and epithelial cells. **Infect Immun**, vol. 68, p. 5401–5404, 2000.

SZU, S.C. *et al.* Relation between Structure and Immunologic Properties of the Vi Capsular Polysaccharide. **Infect Imm.**, vol.59, p. 4555-4561, 1991.

SZU, S.C. Development of Vi conjugate — a new generation of typhoid vaccine. **Expert Rev Vaccines**, vol. 12, p. 1273-1286, 2013.

TAKEDA, K., *et al.* S. Toll-like receptors. **Annual rev immunol.**, vol. 21, p. 1–46, 41, 2003.

TALBOT, S. *et al.* Toll-like receptor 4 signalling through MyD88 is essential to control *Salmonella enterica* serovar typhimurium infection, but not for the initiation of bacterial clearance. **Immunol**, vol. 128, p. 472-783, 2009.

TEIXEIRA, C.R. *et al.* Potential of KM+ lectin in immunization against *Leishmania amazonensis* infection. **Vaccine.**, vol. 24, p. 3001-3008, 2006.

THIEM, V.D. *et al.* The Vi Conjugate Typhoid Vaccine Is Safe, Elicits Protective Levels of IgG Anti-Vi, and Is Compatible with Routine Infant Vaccines. **Clin, Vaccine Immunol.**, vol. 18, p. 730-735, 2011.

TOUSSI; MASSARI. Immune Adjuvant Effect of Molecularly-defined Toll-Like Receptor Ligands. **Vaccines**, vol. 2, p. 323-353, 2014.

UNITT; HORNIGOLD. Plant lectins are novel Toll-like receptor agonists. **Bioch Pharmacol**, vol. 81, p. 1324- 1328, 2011.

UPPINGTON, H. *et al.* Effect of immune serum and role of individual Fcγ receptors on the intracellular distribution and survival of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in murine macrophages. **Immunology**, vol. 119, p. 147-158, 2006.

VALANNE, S. *et al.* The Drosophilla Toll signaling pathway. **J Immunol.**, vol. 186, p. 649-656, 2011.

VAN DAMME, E.J.M. *et al.* Plant Lectins. **Adv Botanical Res**, vol. 48, p. 107-209, 2008.

VAN DAMME, E.J.M. *et al.* Plant lectins: a composite of several distinct families of structurally and evolutionarily related proteins with diverse biological roles. **Crit Rev Plant Sciences**, vol. 17, p. 575-692, 1998.

VAN PARIJS, J. *et al.* Hevein: an antifungal protein from rubber-tree (*Hevea brasiliensis*) latex. **Planta**. 1991 vol. 183, p. 258-64, 1991.

VAZQUEZ-TORRES, A. *et al.* Defective localization of the NADPH phagocyte oxidase to Salmonella-containing phagosomes in tumor necrosis factor p55 receptor-deficient macrophages. **Proc Natl Acad Sci**, vol. 98, p. 2561–2565, 2001.

VAZQUEZ-TORRES, A. *et al.* *Salmonella* Pathogenicity Island 2-Dependent Evasion of the Phagocyte NADPH Oxidase. **Science**, vol. 287, p. 1655-1658, 2000.

ZAKI, S.A.; KARANDE, S. Multidrug-resistant typhoid fever: a review. **J Infect Dev Ctries.**, vol. 5, p. 324-337, 2011.

ZHANG, J.; JIANXIONG, A. Cytokines, Inflammation and Pain. **Int Anesthesiol Clin.**, vol. 2, p. 27-37, 2007.

YOON, T.J. *et al.* Cellular and humoral adjuvant activity of lectins isolated from Korean mistletoe (*Viscum album colaratum*). **Int Immunopharmacol.**, vol. 1, p. 881-889, 2001.

WALMSLEY, A.M.; ARNTZEN, C.J. Plants for delivery of edible vaccines. **Cur. Opin. Biotechnol.**, vol. 11, p. 126-129, 2000.

WEARNE, K. *et al.* Isolation of banana lectin-a practical scale procedure from ripe banana fruit. **Preparat Bioch Biotechnol**, vol 43, p.285-292, 2013.

WEISS, D.S. *et al.* Toll-like receptors are temporally involved in host defense. **J Immunol**, vol. 172, p. 4463-4469, 2004.

WICK, M.J. *et al.* The role of dendritic cells in the immune response to *Salmonella*. **Immunol Let**, vol. 85, p. 99-102, 2003.

WILSON R. P. *et al.* The Vi-capsule prevents Toll-like receptor 4 recognition of *Salmonella*. **Cell. Microbiol**, vol. 10, p. 876–890, 2008.

WINN, W.C. *et al.* **Koneman, diagnóstico microbiológico: texto e atlas colorido**. 6ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

WILSON, R.P. *et al.* The Vi capsular polysaccharide prevents complement receptor 3-mediated clearance of *Salmonella enterica* serotype Typhi. **Infect Immun**. vol. 79, p.830-837, 2011.

WILSON, R.P. *et al.* The Vi-capsule prevents Toll-like receptor 4 recognition of *Salmonella*. **Cell Microbiol**, vol. 10, p. 876-890, 2008.

YRLID, U. *et al.* *Salmonella* infection of bone marrow-derived macrophages and dendritic cells: influence on antigen presentation and initiating an immune response. **FEMS Immunol Med Microbiol**, vol. 27, p. 313-320, 2000.

YRLID, U. *et al.* In vivo activation of dendritic cells and T cells during *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infection. **Infect Immun.**, vol. 69, p. 5726-5735, 2001.

CAPÍTULO I

Lectinas vegetais ConBr e CFL modulam a expressão de receptores Toll-like, citocinas pró-inflamatórias e reduzem a carga bacteriana em macrófagos infectados com *Salmonella enterica* serovar Typhimurium

Artigo publicado na Revista Phytomedicine, ISSN: 0944-7113. Qualis A2 na área de Biotecnologia.

Lectinas vegetais ConBr e CFL modulam a expressão de receptores Toll-like, citocinas pró-inflamatórias e reduzem a carga bacteriana em macrófagos infectados com *Salmonella enterica* serovar Typhimurium

Batista JEC ^a, Ralph MT ^a, Vaz RV ^a, Souza, PFC ^a, Silva AB ^b, Nascimento, DCO ^a, Souza LT^a, Ramos MV ^b, Mastroeni P ^{c*}, Lima-Filho JV ^{a*}

^a Departamento de Biologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife-PE, Brasil.

^b Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza-CE, Brasil.

^c Departamento de Medicina Veterinária, Universidade de Cambridge, Cambridge, Reino Unido.

*Autores de correspondência: José Vitor Lima-Filho, Rua Dom Manoel de Medeiros s/n, Departamento de Biologia, Lab. De Microbiologia e Imunologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife-PE Brazil, CEP 52171-900. E-mail: jose.mlimafo@ufrpe.br, Tel: + 55 31 81 33206312; Pietro Mastroeni, Department of Veterinary Medicine, University of Cambridge, Madingley Road, Cambridge-United Kingdom, CB3 0ES. E-mail: pm274@cam.ac.uk, Tel: +44 1223 765800.

Resumo

Background: Lectinas vegetais têm sido utilizadas na pesquisa biomédica como imunomoduladores capazes de induzir resposta imunológica contra células tumorais e infecções microbianas.

Proposta: Testar a capacidade das lectinas vegetais ConBr (*Canavalia brasiliensis*) e CFL (*Cratylia argentea*) de induzir atividades imunomoduladoras e antimicrobianas em macrófagos peritoneais (MØp) infectados por uma cepa virulenta de *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium (STm).

Métodos: MØp foram incubados com as lectinas ConBr e CFL em concentrações não tóxicas antes (tratamento preventivo) ou após (tratamento curativo) a exposição à STm.

Resultados: Em MØp não infectados, ConBr e CFL aumentaram os níveis de transcritos de RNAm para IL-1 β , TNF- α e IL-6, além da enzima óxido nítrico sintase induzida (iNOs), mas não induziram IL-10 e IL-12. A exposição de esplenócitos naïve ao sobrenadante de macrófagos previamente estimulados com CFL resultou na expressão de IL-12 e IFN- γ . Ambos os tratamentos preventivo e curativo reduziram significativamente a quantificação bacteriana intracelular de *Salmonella*. Experimentos em macrófagos expostos às lectinas e infectados, no tratamento preventivo, mostraram o aumento no nível de transcritos para IL-6 e TNF- α por CFL, já ConBr induziu o aumento de IL-12 (p40). No tratamento curativo, CFL induziu expressão significativa de IL-12 (p40), enquanto ConBr aumentou a expressão gênica de IL-1 β e TNF- α . Independentemente do tipo de tratamento, curativo ou preventivo, as lectinas não influenciaram na expressão de iNOs em MØp infectados com STm C5. O tratamento curativo com CFL aumentou cerca de 130 vezes a expressão de TLR-4, já ConBr aumentou a expressão de TLR-9.

Conclusão: As lectinas ConBr e CFL possuem propriedades imunomoduladoras benéficas no controle de células infectadas por *Salmonella*.

Palavras-chave: *Canavalia brasiliensis*, *Cratylia argentea*, lectinas ligadoras de manose, imunomoduladores.

Abreviações:

ConBr – lectina de *Canavalia brasiliensis*; CFL – lectina de *Cratylia argentea*; MØp – macrófagos peritoneais de camundongos; PBS – Tampão fostato salino; RNAm – RNA mensageiro; cDNA – DNA complementar; TNF- α – Fator de Necrose Tumoral alfa; IL-6 – Interleucina 6; IL-12 (p35) – interleucina 12, subunidade p35; IL-12 (p40) – interleucina 12, subunidade p40; IL-1 β – Interleucina-1 beta; iNOS – Enzima óxido nítrico sintase induzida; NO – Óxido nítrico; TLR – Receptor do tipo Toll-like; NLR – Receptor do tipo NOD; NK – linfócito Natural Killer.

Introdução

Terapias imunomoduladoras que aumentem a imunidade protetora antimicrobiana podem representar uma nova ferramenta para contrabalancear mecanismos de evasão do sistema imune por bactérias patogênicas. Essas terapias adjuvantes incluem peptídeos e agonistas de receptores do tipo Toll (TLRs) e NOD (NLRs) que podem ser administrados isoladamente ou co-administrados com antibióticos, atuando como adjuvantes terapêuticos (Hancock et al., 2012). As lectinas estão amplamente distribuídas na natureza e podem ser especialmente isoladas de plantas nas quais estão envolvidas com mecanismos de defesa contra insetos e micro-organismos. Essas proteínas têm sido bastante utilizadas em pesquisas biomédicas como imunomoduladores capazes de induzir respostas contra células tumorais e infecções microbianas (Silva, Correia, 2014). As lectinas vegetais se ligam reversivelmente a carboidratos específicos presentes na superfície celular, podendo resultar na modulação de processos fisiológicos. Por exemplo, a lectina vegetal ConA (jack bean – *Canavalia ensiformis*) (L.) DC: (Fabaceae) foi capaz de ativar a produção de citocinas pró-inflamatórias e óxido nítrico, o qual foi correlacionado com a alta expressão de diferentes ligantes TLR em cultura celular de macrófagos (Sodhi et al., 2007).

O potencial de proteínas laticíferas e lectinas como terapia adjuvante contra infecções bacterianas, utilizando modelo murino representativo das características biológicas relacionadas à infecção por *Salmonella*, tem sido avaliado pelo nosso grupo de pesquisa (Oliveira et al., 2012; Ralph et al., 2014; Silva et al., 2016). Os membros do gênero *Salmonella* são bactérias gram-negativas causadoras de doenças entéricas sistêmicas (febre tifoide e paratifoide), gastroenterites e septicemia

não-tifoide em humanos e outros animais em todo o mundo. *S. Typhi* causa cerca de 22 milhões de casos e 200,000 óbitos anualmente, já *S. Paratyphi* é responsável por 5.5. milhões de casos em humanos (Crump, Mintz, 2010). Sorotipos de *Salmonella* não-tifoide (NTS) causam gastroenterites em indivíduos saudáveis, mas são a causa comum de sepse letal em indivíduos imunocomprometidos e crianças, especialmente nos países em desenvolvimento (Crump et al., 2015). Doenças causadas por *Salmonella* não-tifoide invasiva (NTSi) são a principal causa de morbidade e mortalidade, especialmente na África sub-Saharan (SSA) (Reddy et al., 2010). O número de casos fatais decorrentes de infecção por NTSi é excessivamente alto (20%), onde 68% dos óbitos ocorrem em crianças com menos de cinco anos de idade.

As lectinas ConBr e CFL obtidas das sementes, respectivamente de *Canavalia brasiliensis* e *Cratylia argentea* (Desv.) Kuntze (Fabaceae) (sinônimo: *C. floribunda* e *Dioclea argentea*), foram bastante estudadas quanto às suas especificidades de ligação a carboidratos (Ramos et al., 2002) e estrutura molecular (Julia Sanz-Aparício et al., 1997; Del Sol et al., 2007). Ambas as lectinas foram descritas como glicose/manose específicas (Ramos et al., 1996); compostas de uma única cadeia de aminoácidos que compreende 237 resíduos e massa de 25,000 Da (Calvete et al., 1999). Além disso, tais lectinas mostraram ser importantes ferramentas para o estudo da atividade celular relacionada à diferentes estímulos inflamatórios e imunológicos através de estudos *in vitro* e *in vivo*. ConBr foi capaz de induzir o aumento na liberação de histamina, produção de óxido nítrico e ativação e proliferação de linfócitos (Barral-Neto et al., 1992; Gomes et al., 1994; Andrade et al., 1999). Em contrapartida, CFL foi capaz de impedir o recrutamento de leucócitos em modelo clássico de inflamação (Assreuy et al, 1997). Em estudo recente, a administração intraperitoneal de ConBr e CFL em camundongos suíços diminuiu a carga bacteriana e aumentou as taxas de sobrevivência após desafio com *S. Typhimurium* (Silva et al., 2016). Embora essas lectinas não tenham induzido a produção de citocinas pró e anti-inflamatórias no fluido peritoneal de animais não infectados, TNF- α foi inibido após infecção, prevenindo o choque séptico. Todavia, os mecanismos pelos quais a proteção é conferida não estão completamente elucidados. O presente estudo visou avaliar se ConBr e CFL são capazes de potencializar as propriedades antimicrobianas de macrófagos peritoneais infectados por uma cepa virulenta de *S. Typhimurium*. Tais lectinas foram capazes de reduzir a carga bacteriana intracelular através dos tratamentos preventivo e curativo.

Os dados foram discutidos com base em estudos prévios e perspectivas futuras para o uso de lectinas vegetais como imunoterapêuticos.

Material e Métodos

Lectinas vegetais

As sementes maduras de *Canavalia brasiliensis* e *Cratylia argentea* foram coletadas de plantas próximas de Fortaleza (3.7319° S, 38.5267° W). A coleta botânica foi autenticada no Herbário Prisco Bezerra da Universidade Federal do Ceará, onde há exsicatas de ambas as espécies arquivadas. As sementes foram processadas para produzir a farinha fina que foi peneirada para remover os detritos. As lectinas ConBr (*C. brasiliensis*) e CFL (*Cratylia argentea*) foram obtidas seguindo as metodologias descritas por Moreira; Cavada (1984) e Oliveira et al (1991), respectivamente. Brevemente, em ambos os casos, as farinhas obtidas foram dissolvidas em 110 mL de NaCl 0.15 M (1:20; v:v) sob baixa agitação por 2 h a 25 °C. Esta solução foi centrifugada a 15 x g por 20 minutos a 10 °C para remover a fase insolúvel. Os sobrenadantes foram filtrados em papel filtro N.1 e submetidos à cromatografia de afinidade utilizando Sephadex G-50. Os picos não retidos foram eluídos da coluna com a mesma solução de equilíbrio (NaCl 0.15 M). Então, o pico retido foi eluído com uma solução de glicose 0.1 M dissolvido em NaCl 0.15 M a 30 mL/h. A absorbância foi monitorada a 280 nm. Após, as lectinas foram dialisadas em água destilada e liofilizadas. Amostras de ambos os materiais foram submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida a 12.5% (SDS-PAGE) para confirmar a homogeneidade. Além disso, as proteínas foram submetidas à degradação de Edman para determinação de suas sequências de aminoácidos através de um serviço de sequenciamento automatizado (Shimadzu PPSQ). Para os ensaios, soluções estoque das lectinas ConBr e CFL foram preparadas em meio Roswell Park Memorial Institute (RPMI 1640, Sigma). A contaminação das soluções estoque das lectinas por LPS foi descartada após o teste através do ensaio Endosafe-PTS (limite de detecção 0.01-10 EU/mL), seguindo as instruções do fabricante (Charles River-UK).

Animais

Camundongos suíços de 4-6 semanas de idade (peso 30 g \pm 5) foram obtidos do biotério do Laboratório de imunopatologia Keizo Asami (LIKA) da Universidade Federal de Pernambuco, Brasil. Os animais foram mantidos com acesso livre à água e ração padrão (Purina, Pauline, SP, Brasil). Todos os procedimentos foram realizados após a aprovação do comitê de ética experimental da Universidade Federal Rural de Pernambuco (Número da licença: 126/2015).

Micro-organismo

A cepa virulenta *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (strain C5), que tem sido frequentemente usada para mimetizar os sintomas da febre tifoide em modelo murino, foi utilizada no presente trabalho. Para os testes, a cepa foi inoculada em caldo infusão cérebro e coração (BHI) e incubada *overnight* a 37°C. Após centrifugação, as células foram lavadas com tampão fosfato salino (PBS, pH 7.2), e então suspensas em RPMI. O número de células bacterianas na cultura foi estimado por espectrofotometria e as diluições foram realizadas em RPMI para obter o inóculo desejado. A quantificação bacteriana foi confirmada através do plaqueamento de alíquotas dos inóculos em ágar BHI.

Técnicas de cultura celular

Para os ensaios, culturas primárias de macrófagos peritoneais (MØp) ou esplenócitos obtidos de camundongos suíços foram utilizadas. Os MØp foram obtidos sob condições assépticas através de lavagem na cavidade peritoneal de camundongos suíços utilizando 5 ml de RPMI suplementado com 100 U/ml de penicilina e 100 µg/ml de estreptomicina pré-aquecido à 37 °C. O baço foi macerado em PBS suplementado com 1% de Soro Fetal Bovino, filtrado (70 µm) e centrifugado a 1300 rpm por 5 min. Então, o sobrenadante foi descartado e as células tratadas com 500µl de tampão para lise de hemácias (Sigma) por 1 min. A quantificação celular foi realizada em câmara de Neubauer e a viabilidade foi analisada através do método de exclusão, utilizando o corante azul de trypan. As suspensões celulares foram

cultivadas em microplacas de 96 poços ou 24 poços *overnight* a 5% CO₂/ 37°C, dependendo dos experimentos.

Ensaio de toxicidade

As lectinas ConBr ou CFL foram adicionadas aos MØp (2 x 10⁵ células/poço) em microplacas de 96 poços para concentrações finais variando de 2.5 a 320 µg/ml. Doxorubicina (10 µg/ml) e PBS foram utilizados como controles. Após 24 h, a atividade metabólica das células foi medida pela redução de resazurina (0.15 mg/ml in sterile PBS) a resofurina. Os resultados foram analisados em até 4 h por leituras em espectrofotômetro a 578 e 620 nm e expressos como porcentagem relativa às células não tratadas (grupo PBS). Foram realizados três experimentos independentes em triplicata.

Ativação de esplenócitos induzida por citocinas produzidas por MØp tratados com lectinas

MØp foram cultivados em placas de 24 poços (1 x 10⁶ células/poço) com ConBr ou CFL (1 e 10 µg/ml) por 24 h a 5% CO₂/37 °C. O RNA total foi extraído para análise da expressão gênica de TNF-α, IL-1β, IL-6 e IL-12, como descrito abaixo. Os sobrenadantes (100 µl) foram adicionados à placas de 24 poços contendo esplenócitos (1 x 10⁶ células/poço) e após 24 h o RNA total foi obtido para análise da expressão de IL-12 e IFN-γ em cultura de esplenócitos murinos. Em outro experimento, as lectinas foram incubadas com o carboidrato manitol (0,1 M) por 1 h. Após, tais lectinas foram incubadas com MØp por 24 h. Então, a expressão gênica de citocinas inflamatórias foi investigada.

Efeitos das lectinas na carga bacteriana em MØp infectados com S. Typhimurium

MØp foram cultivados em microplacas de 96 poços (0.2 ml, 2 x 10⁵/poço), como descrito acima. Os tratamentos preventivo e curativo serão descritos a seguir: no tratamento preventivo, MØp foram incubados com ConBr e CFL (1 e 10 µg/ml) a 5% CO₂/ 37 °C por 24 h. Então, o sobrenadante foi descartado e 0.2 ml de STm C5 (2 x

10⁷/poço) em cultura *overnight* ressuspensa em RPMI foi adicionada aos poços. Após 4h de incubação a 5% CO₂/37 °C, o sobrenadante foi descartado e as células lavadas com PBS. Então, 0.2 ml de RPMI contendo gentamicina (100 µg/ml) foi adicionado aos poços e as placas foram incubadas por 1 h (5% CO₂/37 °C). Após, o sobrenadante foi descartado e as células foram lavadas com PBS. Então, a quantificação bacteriana foi realizada através da adição de 100 µl de 0.5% Triton X-100 nos poços. Após incubação no gelo por 20 minutos, diluições seriadas foram realizadas em PBS e a quantificação das unidades formadoras de colônias (UFC) foi realizada através do método “drop plate” em ágar BHI. O número de UFC por poço foi obtido após incubação *overnight* a 37 °C.

No tratamento curativo, MØp (0.2 ml, 2 x 10⁵/poço) foram expostos a STm (2 x 10⁷/poço) em microplacas de 96 poços. Após 4 h de incubação (5% CO₂/37 °C), o sobrenadante foi descartado e as células foram lavadas com PBS. Então, 0.2 ml de gentamicina (100 µg/ml em RPMI) foi adicionado aos poços. Após 1 h de incubação (5% CO₂/37 °C), 0.2 ml das lectinas nas concentrações de 1 e 10 µg/ml e gentamicina (10 µg/ml em RPMI) foram adicionadas aos poços. Os resultados foram analisados após 24 h de incubação a 5% CO₂/37 °C, como descrito acima.

Expressão gênica de citocinas, TLRs e da enzima iNOS

Experimentos independentes foram realizados em microplacas de 24 poços para obter o perfil de expressão de citocinas em macrófagos tratados com lectinas e infectados com STm C5. Macrófagos foram submetidos à lise com o reagente TRI (Sigma). O RNA total foi usado para a construção do cDNA utilizando a enzima M-MLV transcriptase reversa (Sigma). O cDNA foi usado para analisar a expressão de Fator de Necrose Tumoral-α (TNF-α), Interleucina-6 (IL-6), Interleucina-1β (IL-1β), Interleucina-12 (subunidades p35 e p40), Interferon gama (IFN-γ), Interleucina-10 (IL-10), receptores Toll-like 2, 4 e 9 e a enzima óxido nítrico sintase induzida (iNOS) por Real-Time RT-PCR (Sigma, SYBR-Green/Quantitativo RT-PCR Kit). O GAPDH murino foi utilizado como controle interno. As sequências de todos os primers estão descritas na tabela 1. A reação de PCR (20 µl) foi realizada como descrito a seguir: 40 ciclos a 95 °C por 35 s, 60 °C por 60 s (Q series Rotor Gene – Qiagen). A fórmula

a seguir foi utilizada para comparação dos níveis de expressão dos genes de interesse (G.I.) entre os grupos controle e experimental:

$$\Delta\Delta Ct = [(Ct \text{ G.I. Controle} - Ct \text{ GAPDH Controle}) - (Ct \text{ G.I. Experimental} - Ct \text{ GAPDH Experimental})]$$

Os resultados foram expressos em termos de variação usando a fórmula $2^{\Delta\Delta Ct}$.

Análise Estatística

As diferenças estatísticas entre os grupos foram obtidas por análises de variância (ANOVA) seguidas pelo teste de Bonferroni com intervalo de confiança de $P < 0.05$. Essas análises foram realizadas e os gráficos correspondentes obtidos utilizando o programa PRISMA versão 5.0.

Resultados

O protocolo de purificação das lectinas foi realizado após obter a certificação taxonômica de que as sementes coletadas estavam relacionadas às espécies *C. brasiliensis* e *C. argentea*. As proteínas obtidas por cromatografia de afinidade em Sephadex G-50 apresentaram-se homogêneas em gel de poliacrilamida (dados não mostrados). Para confirmar o grau de pureza, ambas as lectinas foram analisadas quanto às suas sequências de aminoácidos, como citado em material e métodos. A seguinte sequência N-terminal de aminoácidos foi obtida para as lectinas após 15 ciclos de sequenciamento: ADTIVAVELDTYPNT. Esses dados corroboram com aqueles originalmente reportados por Grangeiro et al. (1997) e Cavada et al. (1999) que demonstraram a sequência primária completa de ambas as lectinas e confirmaram que tais proteínas possuem sequência N-terminal de aminoácidos idêntica.

Os ensaios de toxicidade demonstraram que ConBr e CFL não foram tóxicas em cultura de macrófagos quando comparadas aos MØp não tratados (grupo PBS) em nenhuma das concentrações testadas (Fig. 1). Em contrapartida, a doxorrubicina (10 µg/ml), utilizada como controle, diminuiu em 50% o número de MØp em comparação ao grupo PBS ($P < 0.05$). Considerando os resultados obtidos no ensaio de toxicidade, as concentrações de 1 e 10 µg/ml das lectinas foram utilizadas nos

demais ensaios. A exposição de MØp à ConBr ou CFL por 24 h produziu altos níveis de transcritos para IL-1 β , TNF- α e IL-6 (Fig. 2). A ativação de citocinas foi anulada quando as lectinas foram previamente tratadas com manitol (0,1 M) por 1 h (dados não mostrados). Em contrapartida, transcritos de IL-10 e IL-12 não foram produzidos em nenhuma das concentrações testadas após tratamentos com ConBr e CFL. MØp tratados com 10 μ g/ml de CFL foram capazes de aumentar a expressão de iNOS em aproximadamente 100 vezes, já ConBr prejudicou a expressão da enzima quando analisada na mesma concentração ($P < 0.05$) (Fig. 2). A exposição de esplenócitos naíve ao sobrenadante de MØp tratados previamente com CFL induziu baixos, porém significativos, níveis de transcritos para IL12 (p35) e IFN- γ (Fig. 3). Todavia, esplenócitos estimulados com sobrenadantes de MØp previamente tratados com ConBr não aumentaram a expressão de nenhuma das citocinas analisadas.

O tratamento preventivo com a lectina ConBr ou CFL durante 24 h reduziu significativamente o número de UFC em macrófagos infectados com STm C5 em relação ao grupo controle exposto à PBS ($P < 0.05$) (Fig. 4). Os tratamentos com CFL reduziram de 3 a 6 vezes o número de UFCs enquanto nenhuma colônia foi verificada em macrófagos expostos à ConBr na dose de 10 μ g/ml. Corroborando com tal resultado, a porcentagem de macrófagos viáveis após infecção foi significativamente alta após tratamentos com lectinas em relação ao grupo PBS ($P < 0.05$) (Fig. 4). A produção de transcritos de RNAm para IL-6, TNF- α e IL-12 (p40) foi alta em MØp submetidos ao tratamento preventivo com a lectina CFL, já ConBr aumentou os transcritos para IL-6 e IL-12 (p40) (Fig. 4). Nesse contexto, o tratamento curativo reduziu a quantificação bacteriana intracelular em macrófagos, exceto para CFL na dose de 1 μ g/ml (Fig. 5). Tratamentos com a lectina ConBr na concentração de 10 μ g/ml demonstraram o clareamento bacteriano em macrófagos, já CFL (10 μ g/ml) reduziu cerca de 10 vezes o número de UFCs em relação ao grupo PBS. Os tratamentos com as lectinas também aumentaram a sobrevivência de macrófagos infectados.

Particularmente, CFL induziu a expressão significativa de IL-12 (p40), enquanto ConBr induziu a expressão de IL-1 β e TNF- α (Fig. 5). Transcritos de RNAm para a enzima iNOs não foram observados nos tratamentos preventivo e curativo. Além disso, macrófagos não tratados e infectados com STm C5 aumentaram a expressão

de IL-10 no tratamento curativo, já os tratamentos com ConBr e CFL inibiram a expressão de IL-10. As análises de expressão dos receptores TLRs 2, 4 e 9 demonstraram que ConBr e CFL não induziram níveis significativos de transcritos no tratamento preventivo em relação aos macrófagos não tratados ($P > 0.05$) (Fig. 6). Todavia, o tratamento curativo com CFL aumentou cerca de 130 vezes a expressão de TLR-4, já a expressão de TLR-9 foi significativa após tratamentos com ConBr em relação ao grupo PBS.

Discussão

As estirpes virulentas de *S. Typhimurium* são capazes de sobreviver e se replicar dentro de fagócitos, causando infecções sistêmicas. Os macrófagos ativados produzem espécies reativas de oxigênio e liberam citocinas pró-inflamatórias que desempenham um papel chave na regulação da resposta imune do hospedeiro, limitando a propagação bacteriana (Rosenberger e Finlay, 2002). Estudos *in vitro* têm demonstrado que macrófagos derivados de monócitos humanos infectados por uma cepa selvagem de *S. Typhimurium* expressam rapidamente TNF- α , IL-12 e IL-18 (Pietila et al., 2005). Enquanto o TNF- α e citocinas tais como IL-1 β e IL-6 ativam e recrutam leucócitos, IL-12 e IL-18 induzem linfócitos T-auxiliares 1 (Th1), caracterizados pela produção de IFN- γ (Pham e McSorley, 2015). IFN- γ liberado por células NK e linfócitos CD4+ aumentam a capacidade bactericida de macrófagos através da indução de óxido nítrico em estágios mais avançados da doença (Duque e Descoteaux, 2014). No entanto, *S. Typhimurium* pode causar imunossupressão por meio da indução da citocina anti-inflamatória IL-10, assim suprimindo a produção de IFN- γ e a resposta bactericida de macrófagos (Lee et al, 2011). Neste estudo foi possível demonstrar que as lectinas vegetais ConBr e CFL aumentaram a expressão de citocinas pró-inflamatórias e promoveram as propriedades antimicrobianas de macrófagos infectados com a cepa virulenta *S. Typhimurium* C5.

ConBr e CFL compartilham propriedades moleculares e foram caracterizadas em termo de suas estruturas cristalográficas (Sanz-Aparicio et al., 1997; Calvete et al., 1999). Estudos anteriores de toxicidade demonstraram que ambas as lectinas produziram 100% de mortalidade de moluscos *Biomphalaria glabrata* na concentração

de 50 µg/ml, já a toxicidade contra o microcrustáceo *Artemia salina* teve LC₉₀ de 28.8 e 7.69 ppm para ConBr e CFL, respectivamente (dos Santos et al., 2010). Todavia, a administração intraperitoneal diária das lectinas em camundongos suíços não causou toxicidade aguda, embora tenha havido uma infiltração significativa de leucócitos na cavidade peritoneal dos animais (Silva et al., 2016). Os dados do presente trabalho confirmaram que ConBr e CFL não foram tóxicas em culturas primárias de macrófagos peritoneais e, em baixas concentrações, induziram uma expressão elevada de RNAm para IL-1β, TNF-α e IL-6, que são importantes para a resistência imunológica inicial do hospedeiro às salmoneloses. Embora ConBr e CFL tenham sido relatadas como indutores de apoptose em linhagens celulares cancerígenas, as mesmas se mostraram não tóxicas para células normais humanas mononucleares do sangue periférico (PBMC) em concentrações elevadas até 200 µg/ml (Barral-Neto et al., 1992; Faheina-Martins et al., 2012). Além disso, ConBr e CFL induziram a proliferação de PBMC e alta produção de IFN-γ (Barral-Neto et al., 1992). Neste estudo, os sobrenadantes das culturas de MØp, previamente tratados com CFL (mas não ConBr), aumentaram a expressão de RNAm para IL-12 e IFN-γ por esplenócitos imaturos. Os dados acima sugerem que tratamentos com tais lectinas seriam vantajosos para dar início à cascata oxidativa intracelular nos macrófagos. De fato, no presente estudo os tratamentos preventivos e curativos com as lectinas diminuíram a carga bacteriana intracelular de *S. Typhimurium*.

Anteriormente, macrófagos pré-tratados com a lectina ConA tiveram expressão elevada de TLRs e foram mais susceptíveis à indução de citocinas pró-inflamatórias por ligantes específicas de TLR como, por exemplo, zimosan, PolyI:C, LPS e DNA CpG (Sodhi et al., 2007). Esses efeitos parecem ser devido ao reconhecimento de domínios de carboidratos pelas lectinas, sendo estas, a seguir, apresentadas na superfície da célula para TLRs (Unitt e Hornigold, 2011). Após infecção por *S. Typhimurium*, o reconhecimento de lipopolissacarídeo bacteriano (LPS) via TLR 4/MyD88 desencadeia sinais que induzem TNF-α, IL-6 e IL-12 (p40), enquanto que a ligação de antígenos via TLR-4/TRIF induz interferon do Tipo I e IL-12 (p35) (Dunne et al., 2005; Talbot et al., 2009). No entanto, enquanto macrófagos TLR-2 -/- regulam positivamente a expressão de iNOS, reduzindo a carga bacteriana intracelular, macrófagos TLR-9 -/- diminuem a expressão de espécies reativas de oxigênio (ROS), produzindo um aumento da carga bacteriana (Zhan et al., 2015).

Recentemente, a injeção intraperitoneal de CFL na cavidade peritoneal de camundongos induziu a liberação de NO no fluido peritoneal (não observado para ConBr), que foi reduzida após a infecção por *Salmonella* (Silva et al., 2016). Neste estudo, ConBr e CFL induziram o aumento da expressão de iNOs por macrófagos naive, corroborando com estudos anteriores (Andrade et al., 1999; Assreuy et al., 2009). Todavia, a expressão da enzima iNOs foi prejudicada nos tratamentos após a infecção. Além disso, houve a expressão significativa de TLR-9 em MØp tratados com ConBr, sugerindo que a atividade bactericida do macrófago está associada à produção de derivados de ROS.

Enquanto citocinas pró-inflamatórias são capazes de ativar a capacidade bactericida de macrófagos, IL-10 inibe a produção de oxigênio reativo intracelular e intermediários de nitrogênio (Lee et al., 2011). Embora o NO exógeno proteja macrófagos da apoptose induzida por LPS, altas concentrações de NO causam imunossupressão seguido da infecção causada por *Salmonella* (Malysheva et al., 2006). O presente trabalho demonstrou que as citocinas IL-1 β e TNF- α foram induzidas por ConBr concomitante com a expressão moderada de TLR-4, já CFL induziu a expressão significativa de IL-12 (p40) e expressão moderada de IL-1 β concomitante com a alta expressão de TLR-4. Células apresentadoras de antígenos frequentemente requerem dois sinais fornecidos por LPS e IFN- γ para a expressão das subunidades p35 e p40 e produção da proteína funcional IL-12 (p70) (Murphy et al., 1995; Liu et al., 2003). Os resultados obtidos neste trabalho mostram que os tratamentos com as lectinas foram benéficos para os macrófagos através da regulação negativa na expressão de IL-10 após a infecção por STm C5. Além disso, a falta de transcritos de IL-10 em MØp infectados, mas não tratados no tratamento preventivo, foi atribuído ao curto tempo de infecção.

Neste estudo foi possível demonstrar que as lectinas vegetais ConBr e CFL aumentam a imunidade antimicrobiana de macrófagos experimentalmente infectados por *S. Typhimurium*. As propriedades imunomodulatórias de lectinas vegetais têm sido investigadas para o controle de infecções parasitárias. Por exemplo, a lectina ScLL do látex de *Synadenium carinatum*, utilizada como adjuvante juntamente com antígenos solúveis de *Leishmania* em modelo murino de vacinação, mostrou-se capaz de reduzir a carga de parasitas em macrófagos, que foi acompanhada da expressão de TNF- α , IL-12 e IFN- γ (Afonso-Cardoso et al., 2007). No entanto, estudos semelhantes com

estirpes de bactérias intracelulares não foram identificados. Neste estudo, a proteção contra *Salmonella* foi reforçada devido à indução de citocinas pró-inflamatórias com envolvimento dos receptores TLR4 e 9 e, em menor grau, TLR-2. Assim, concluí-se que as lectinas ConBr e CFL têm propriedades imunomoduladoras que são benéficas ao controle de células infectadas por cepa virulenta de *Salmonella*.

Conflito de interesse

Os autores não possuem conflitos de interesse para declarar.

Agradecimentos

O presente estudo foi financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (Programa de Pesquisador Visitante especial/CNPq). Os autores agradecem ainda à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de doutorado para o primeiro autor.

Referências

Afonso-Cardoso, S.R., Rodrigues, F.H., Gomes, M.A., Silva, A.G., Rocha, A., Guimaraes, A.H., Candeloro, I., Favoreto, S. Jr., Ferreira, M.S., de Souza, M.A., 2007. Protective effect of lectin from *Synadenium carinatum* on *Leishmania amazonensis* infection in BALB/c mice. *Korean J Parasitol.* 45, 255-266.

Andrade, J.L., Arruda, S., Barbosa, T., Paim, L., Ramos, M.V., Cavada, B.S., Barral-Netto, M., 1999. Lectin-induced nitric oxide production. *Cell Immunol.* 25, 98-102.

Assreuy, A.M., Shibuya, M.D., Martins, G.J., De Souza, M.L., Cavada, B.S., Moreira, R.A., Oliveira, J.T., Ribeiro, R.A., Flores, C.A., 1997. Anti-inflammatory effect of glucose-mannose binding lectins isolated from Brazilian beans. *Mediators Inflamm.* 6, 201-210.

Barral-Neto, M., Santos, S.B., Barral, A., Moreira, L.I., Santos, C.F., Moreira, R.A., Oliveira, J.T., Cavada, B.S., 1992. Human lymphocyte stimulation by legume lectins from the Diocleae tribe. *Immunol. Invest.* 21, 297-303.

Calvete, J.J., Thole, H.H., Raida, M., Urbanke, C., Romero, A., Grangeiro, T.B., Ramos, M.V., Almeida da Rocha, I.M., Guimarães, F.N., Cavada, B.S., 1999. Molecular characterization and crystallization of Diocleinae lectins. *Biochim. Biophys Acta* 1430, 367-375.

Cavada, B.S., Nogueira, N.A.P., Freitas, C.M.S.A., Grangeiro, T.B., Ramos, M.V., Thole, H.H., Rouge, P. Calvete, J.J., 1999. Primary structure and kinetic interaction with glycoproteins of the lectin from seeds of *Cratylia floribunda*. *Pro. Pep. Lett.* 6, 27-34.

Crump, J.A., Mintz, E.D., 2010. Global trends in typhoid and paratyphoid Fever. *Clin. Infect. Dis.* 50, 241-246.

Crump, J.A., Sjölund-Karlsson, M., Gordon, M.A., Parry, C.M., 2015. Epidemiology, Clinical Presentation, Laboratory Diagnosis, Antimicrobial Resistance, and Antimicrobial Management of Invasive *Salmonella* Infections. *Clin. Microbiol. Ver.* 28, 901-37.

Del Sol, F.G., Cavada, B.S., Calvete, J.J., 2007. Crystal structures of *Cratylia floribunda* seed lectin at acidic and basic pHs. Insights into the structural basis of the pH-dependent dimer-tetramer transition. *J. Struct. Biol.* 158, 1-9.

dos Santos, A.F., Cavada, B.S., da Rocha, B.A., do Nascimento, K.S., Sant'Ana, A.E., 2010. Toxicity of some glucose/mannose-binding lectins to *Biomphalaria glabrata* and *Artemia salina*. *Bioresour Technol.* 101, 794-798.

Dunne, A., O'Neill, L.A., 2005. Adaptor usage and Toll-like receptor signaling specificity. *FEBS Lett.* 579, 3330-3335.

Duque, G.A., Descoteaux, A., 2014. Macrophage cytokines: involvement in immunity and infectious diseases. *Front. Immunol.* 5, 1-12.

Faheina-Martins, G.V., da Silveira, A.L., Cavalcanti, B.C., Ramos, M.V., Moraes, M.O., Pessoa, C., Araújo, D.A., 2012. Antiproliferative effects of lectins from *Canavalia ensiformis* and *Canavalia brasiliensis* in human leukemia cell lines. *Toxicol. In Vitro.* 26, 1161-1169.

Gomes, J.C., Ferreira, R.R., Cavada, B.S., Moreira, R.A., Oliveira, J.T., 1994. Histamine release induced by glucose (mannose)- specific lectins isolated from Brazilian beans. Comparison with concanavalin A. *Agents Actions* 41, 132-135.

Grangeiro, T.B., Schriefer, A., Calvete, J.J., Raida, M., Urbanke, C. Barral-Netto, M. Cavada, B.S., 1997. Molecular cloning and characterization of ConBr, the lectin of *Canavalia brasiliensis* seeds. *Eur. J. Biochem.* 248, 43-48.

Hancock R.E., Nijnick, A., Philpott, D.J., 2012. Modulating immunity as a therapy for bacterial infections. *Nat. Rev. Microbiol.* 10, 243-254.

Lee, K.S., Jeong, E.S., Heo, S.H., Seo, J.H., Jeong, D.G., Choi, Y.K., 2011. IL-10 suppresses bactericidal response of macrophages against *Salmonella Typhimurium*. *J. Microbiol.* 49, 1050-1053.

Liu, J., Cao, S., Herman, L.M., Xiaojing, Ma., 2003. Differential regulation of interleukin (IL)-12 p35 and p40 gene expression and interferon (IFN)- γ -primed IL-12 production by IFN regulatory factor 1. *J. Exp. Med.* 198, 1265-1276.

Malysheva, E.V., Kruglov, S.V., Khomenko, I.P., Bakhtina, L.Y., Pshennikova, M.G., Manukhina, E.B., Malyshev, I.Y., 2006. Role of extracellular and intracellular nitric oxide in the regulation of macrophage responses. *Bull. Exp. Biol. Med.* 141, 404-406.

Moreira, R.A., Cavada, B.S., 1984. Lectin from *Canavalia brasiliensis* (Mart.). Isolation, characterization and behaviour during germination. *Biol. Plantarum* 26, 113-120.

Murphy, T.L., Cleveland, M.G., Kulesza, P., Magram, J., Murphy, K.M., 1995. Regulation of interleukin 12 p40 expression through an NF-kappa B half-site. *Mol. Cell. Biol.* 10, 5258-67.

Oliveira, J.T.A., Cavada, B.S., Moreira, R.A., 1991. Isolation and partial characterization of a lectin from *Cratylia floribunda* Mart. *Seeds. Ver. Bras. Bot.* 14, 61-66.

Oliveira, R.S.B., Figueiredo, I.S., Freitas, L.B., Pinheiro, R.S., Brito, G.A., Alencar, N.M., Ramos, M.V., Ralph, M.T., Lima-Filho, J.V., 2012. Inflammation induced by phytomodulatory proteins from the latex of *Calotropis procera* (Asclepiadaceae) protects against *Salmonella* infection in a murine model of typhoid fever. *Inflamm. Res.*, 61, 689-698.

Pham, O.H., McSorley S.J., 2015. Protective host immune responses to *Salmonella* infection. *Future Microbiol.* 10, 101-110.

Pietilä, T.E., Veckman, V., Kyllönen, P., Lähteenmäki, K., Korhonen, T.K., Julkunen, I., 2005. Activation, cytokine production, and intracellular survival of bacteria in *Salmonella*-infected human monocyte-derived macrophages and dendritic cells. *J. Leukoc. Biol.* 78, 909-20.

Ramos, M.V., Cavada, B.S., Mazard, A.M., Rougé, P., 2002. Interaction of Diocleinae lectins with glycoproteins based in surface plasmon resonance. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 97, 275-279.

Ramos, M.V., Moreira, R.A., Cavada, B.S., Oliveira, J.T.A., Rougé, P., 1996. Interaction of lectins from the Diocleinae sub-tribe with specific ligands. *Revt. Bras. Fisiol. Veg.* 8, 193-199.

Ralph, M.T., Silva, A.F.B., Silva, D.L., Nascimento, D.C.O., Silva, D.M.F., Gomes-Filho, M.A., Souza, P.R.E., Evêncio-Neto, J., Ramos, M.V., Salas, C.E., Lima-Filho, J.V., 2014. Peptidases from Latex of *Carica candamarcensis* Upregulate COX-2 and IL-1 mRNA Transcripts against *Salmonella enterica* ser. Typhimurium-Mediated Inflammation. *Mediators Inflamm.* 2014, 1-8.

Reddy, E.A., Shaw, A.V., Crump, J.A., 2010. Community-acquired bloodstream infections in Africa: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect. Dis.* 10, 417-32.

Rosenberger, C.M., Finlay, B.B., 2002. Macrophages inhibit *Salmonella* typhimurium replication through MEK/ERK kinase and phagocyte NADPH oxidase activities. *J. Biol. Chem.* 24, 18753-18762.

Sanz-Aparicio, J., Hermoso, J., Grangeiro, T.B., Calvete, J.J., Cavada, B.S., 1997. The crystal structure of *Canavalia brasiliensis* lectin suggests a correlation between its quaternary conformation and its distinct biological properties from Concanavalin A. *FEBS Lett.* 405, 114-118.

Silva, A.F.B., Matos, M.P., Ralph, M.T., Silva, D.L., de Alencar, N.M., Ramos, M.V., Lima-Filho, J.V., 2016. Comparison of immunomodulatory properties of mannose-binding lectins from *Canavalia brasiliensis* and *Cratylia argentea* in a mice model of *Salmonella* infection. *Int. Immunopharmacol.* 31, 233-238.

Silva, L.C.M., Correia, M.T.S., 2014. Plant lectins and Toll-like receptors: implications for therapy of microbial infections. *Front. Microbiol.* 5, 1-3.

Sodhi, A., Tarang, S., Kesharwani, V., 2007. Concanavalin A induced expression of Toll-like receptors in murine peritoneal macrophages *in vitro*. *Int. Immunopharmacol.* 7, 454-463.

Talbot, S., Töttemeyer, S., Yamamoto, M., Akira, S., Hughes, K., Gray, D., Barr, T., Mastroeni, P., Maskell, D.J., Bryant, C.E., 2009. Toll-like receptor 4 signalling through

MyD88 is essential to control *Salmonella enterica* serovar typhimurium infection, but not for the initiation of bacterial clearance. *Immunol.* 128, 472-83.

Unitt, J., Hornigold, D., 2011. Plant lectins are novel Toll-like receptor agonists. *Biochem. Pharmacol.* 81, 1324-1328.

Zhan, R., Han, Q., Zhang, C., Tian, Z., Zhang, J., 2015. Toll-Like receptor 2 (TLR2) and TLR9 play opposing roles in host innate immunity against *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infection. *Infect Immun.* 83, 1641-1649.

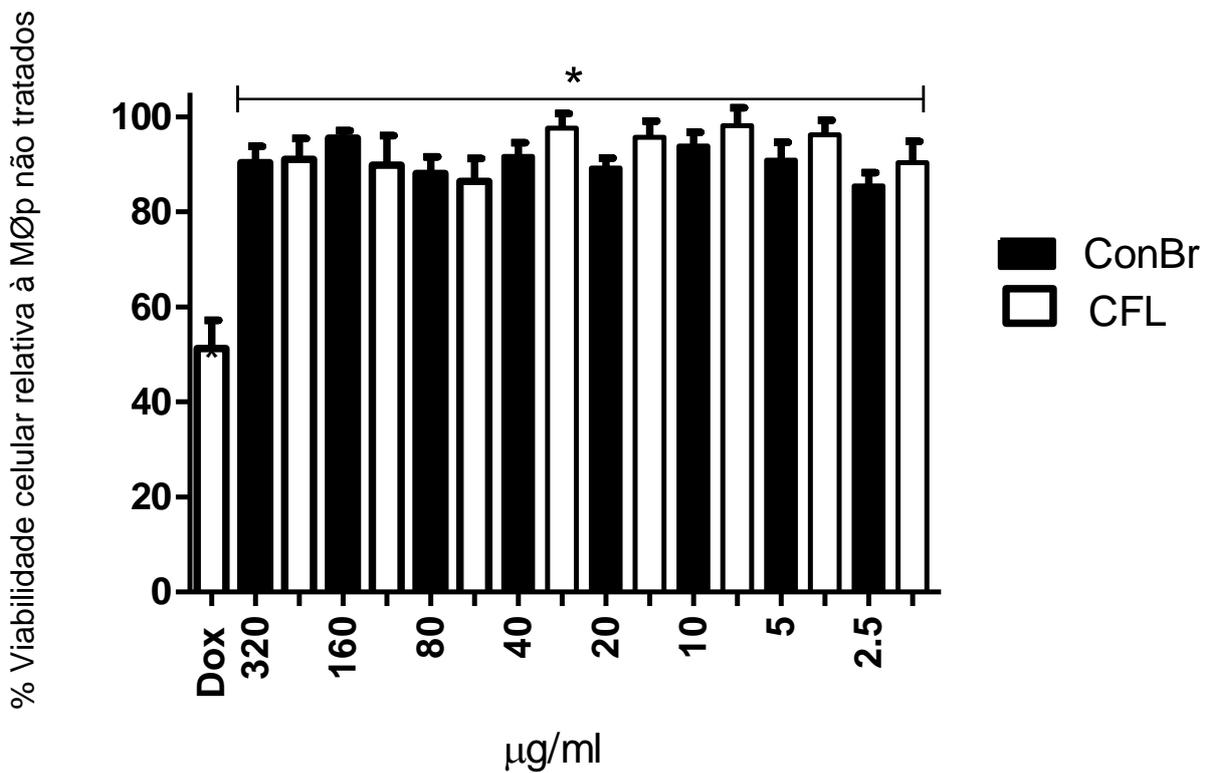


Fig. 1. Viabilidade celular após a exposição de macrófagos peritoneais às lectinas de *Canavalia brasiliensis* (ConBr) e *Cratylia argentea* (CFL). Os macrófagos foram incubados com ConBr ou CFL em placas de 96 poços em diferentes concentrações durante 24 h. A viabilidade celular foi avaliada através da medição da redução de resazurina em resofurina. Os resultados foram analisados até 4 h por leituras espectrofotométricas a 578 e 620 nm, e expressos como porcentagem em relação às células não tratadas (grupo PBS). Doxorubicina (Dox, 10 µg/ml) foi utilizado como controle técnico. * P < 0,05 através ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni, comparação com doxorubicina no mesmo período de tempo. Comparações entre as doses não apresentaram diferenças significativas.

MØp Não infectados

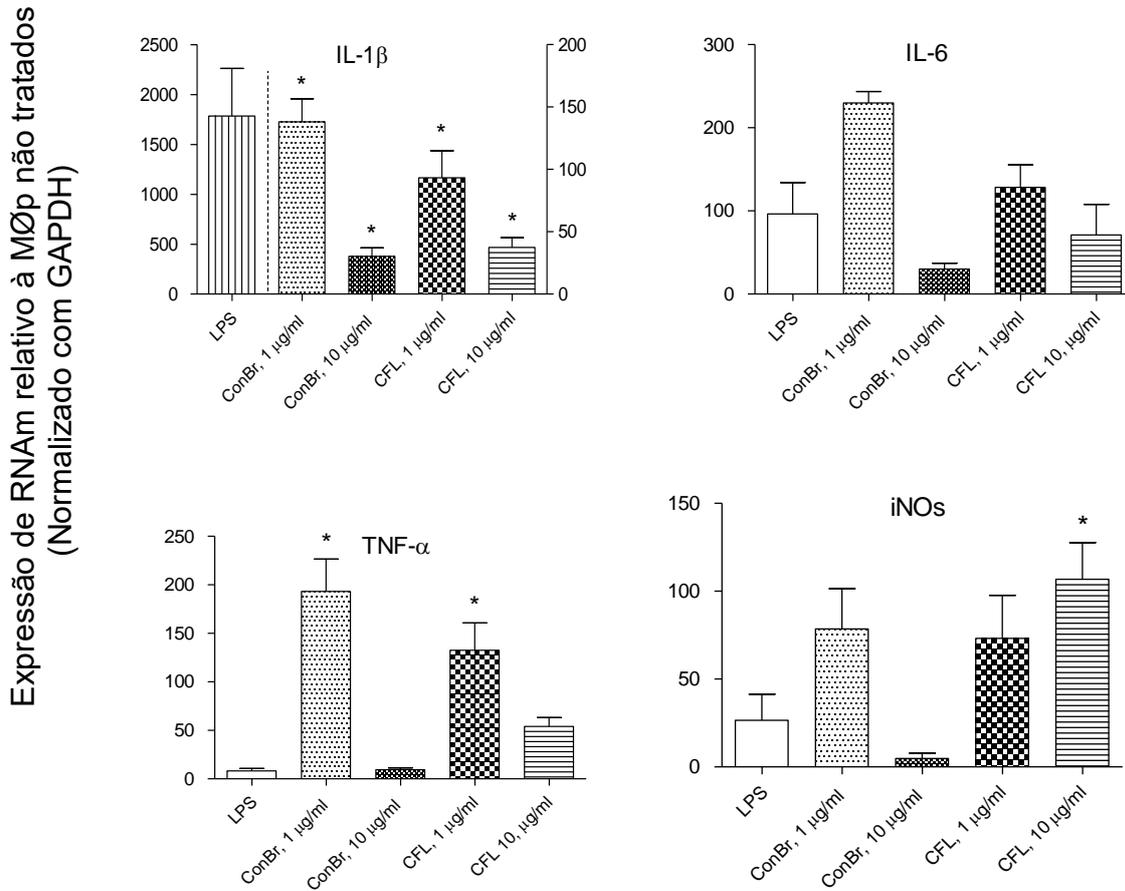


Fig. 2. Expressão de RNAm para citocinas e enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOs) em macrófagos peritoneais cultivados com as lectinas ConBr e CFL durante 24 h. Os resultados estão expressos como variação relativa aos macrófagos não infectados e não tratados (grupo PBS). Lipopolissacarídeo (LPS) (5 µg/ml) foi utilizado como controle. Os dados representam uma de pelo menos três medidas independentes. * $P < 0.05$ por ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni, comparação ao grupo LPS.

Expressão de RNAm relativa à esplenócitos não tratados
(Variação relativa, normalizado com GAPDH)

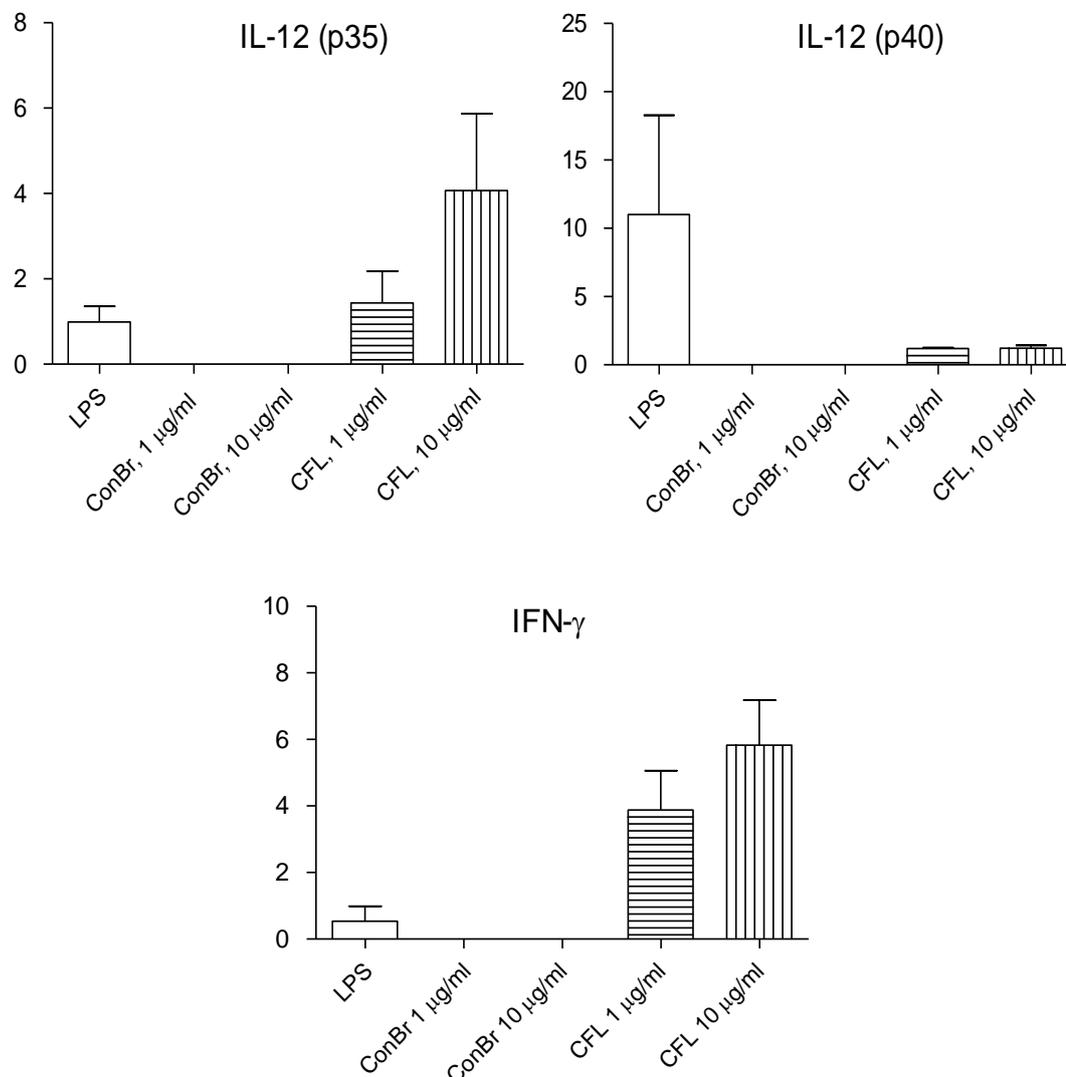
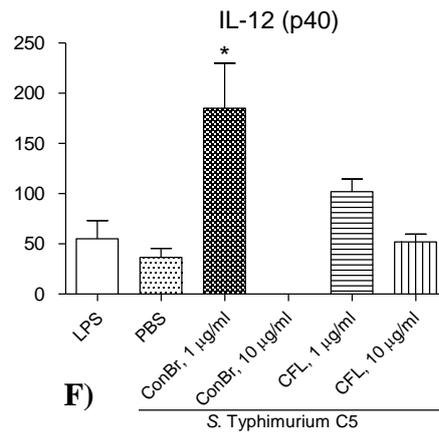
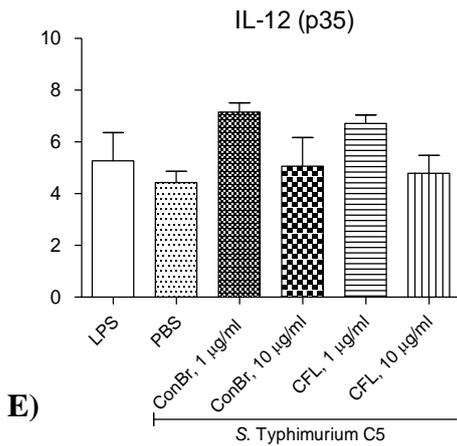
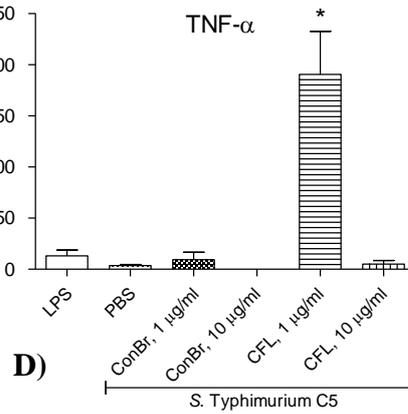
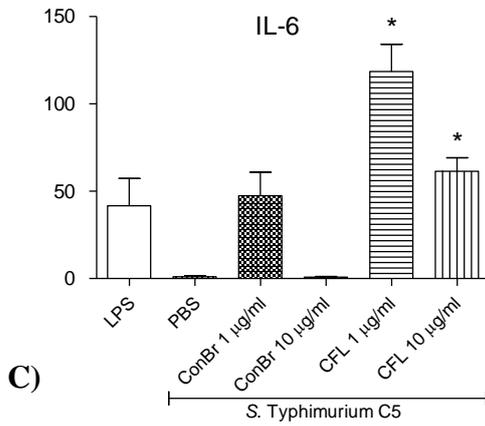
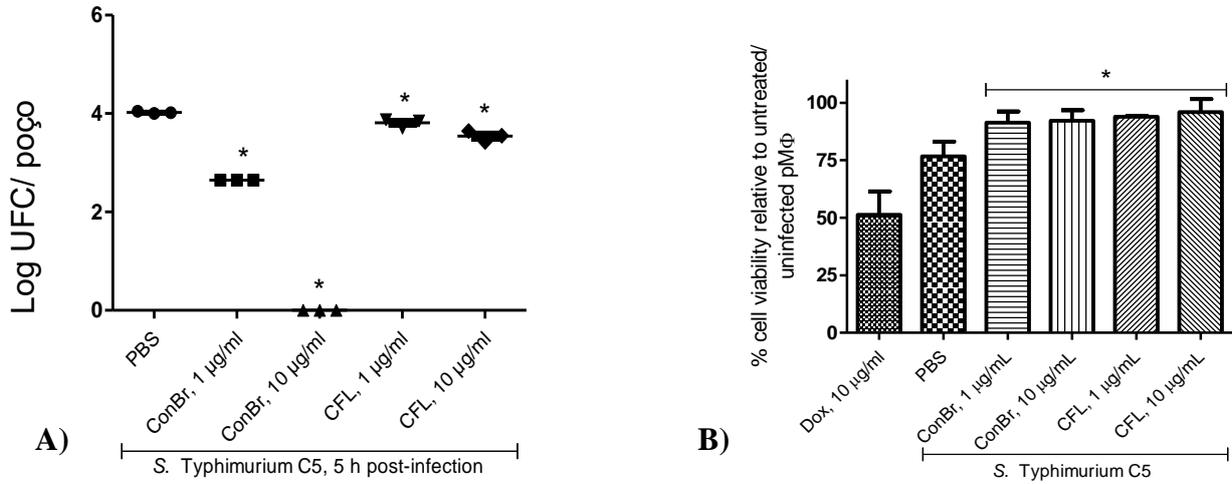


Fig. 3. Expressão de RNAm para citocinas em esplenócitos após o estímulo com sobrenadantes de macrófagos peritoneais previamente expostos a ConBr e CFL. Os resultados estão expressos como variação relativa aos esplenócitos não tratados e não infectados (grupo PBS). Lipopolissacarídeo (LPS) (5 µg/ml) foi utilizado como controle. Os dados representam uma de pelo menos três medidas independentes. $P < 0,05$ por ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni, comparação entre ConBr e CFL na mesma dose.

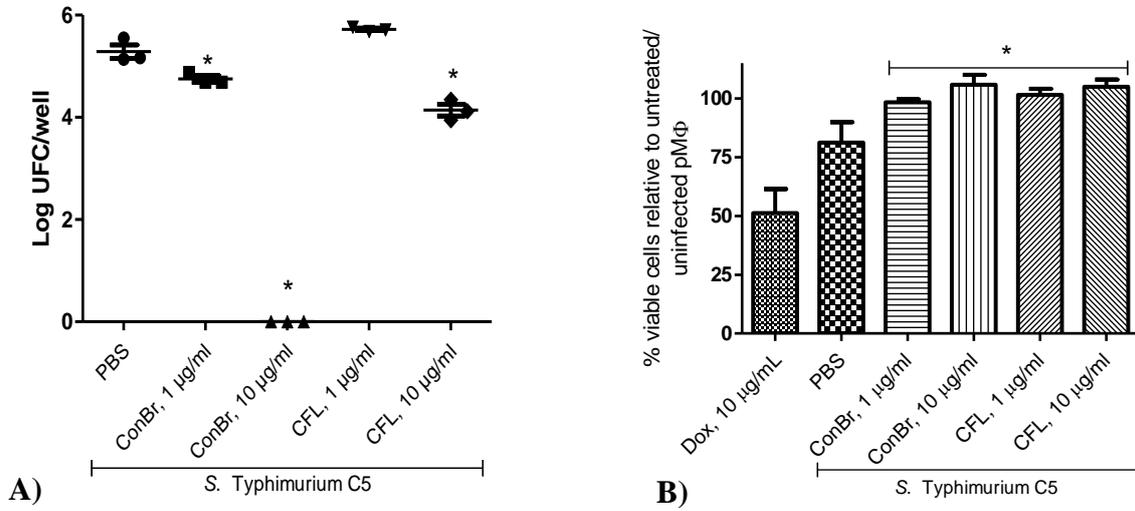
Tratamento Preventivo



Expressão de RNAm relativa à MØp não tratados e não infectados (Variação relativa, normalizado com GAPDH)

Fig. 4. Efeito de ConBr e CFL no controle de infecção por *Salmonella* no tratamento preventivo. A) Carga bacteriana intracelular; B) Viabilidade celular de macrófagos; C-F) Expressão gênica de citocinas. Os MØp foram incubados com ConBr e CFL por 24 h e então infectados por *Salmonella* (STm C5) for 5 h. * P <0,05 por ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni, comparação com o grupo PBS.

Tratamento Curativo



Expressão de RNAm relativa à MØp não tratados e não infectados (Variação relativa, normalizado com GAPDH)

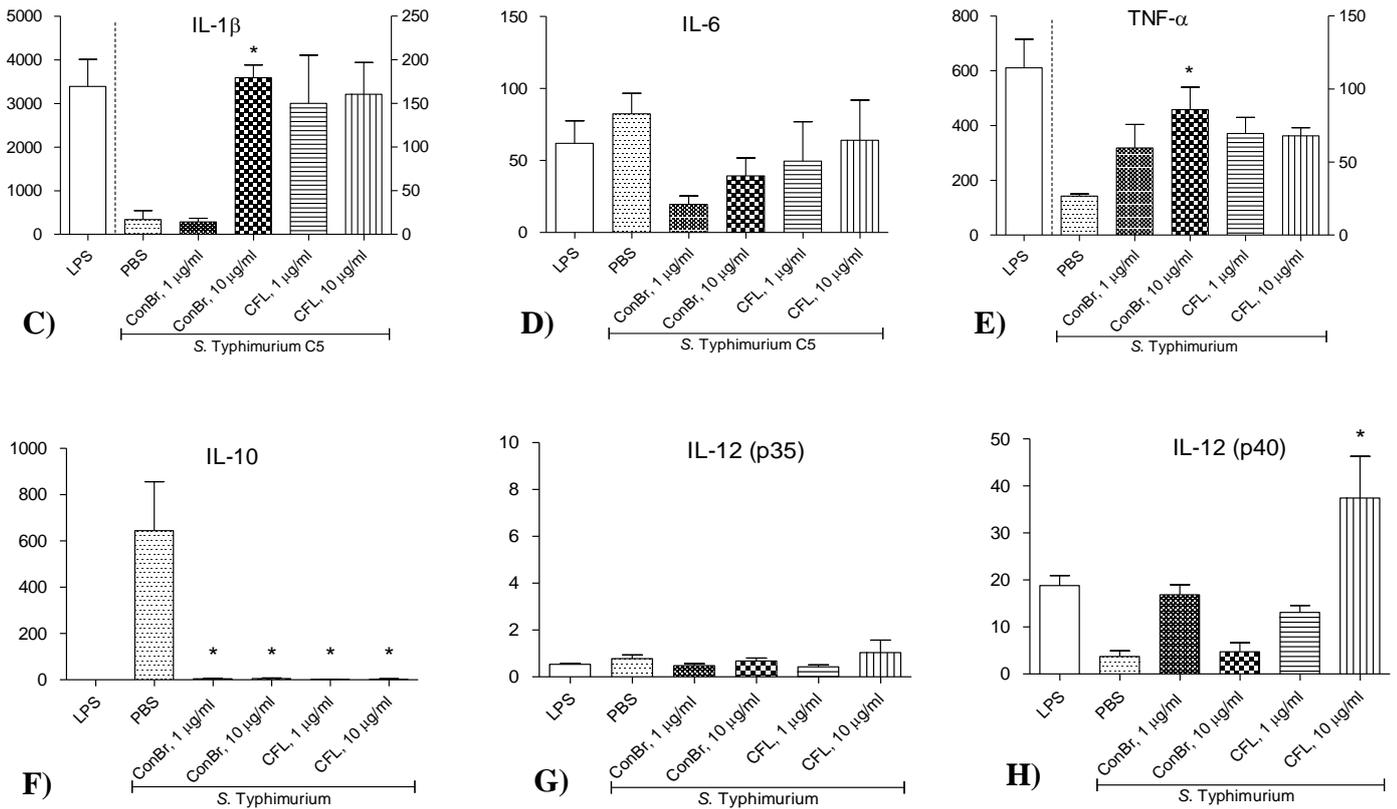
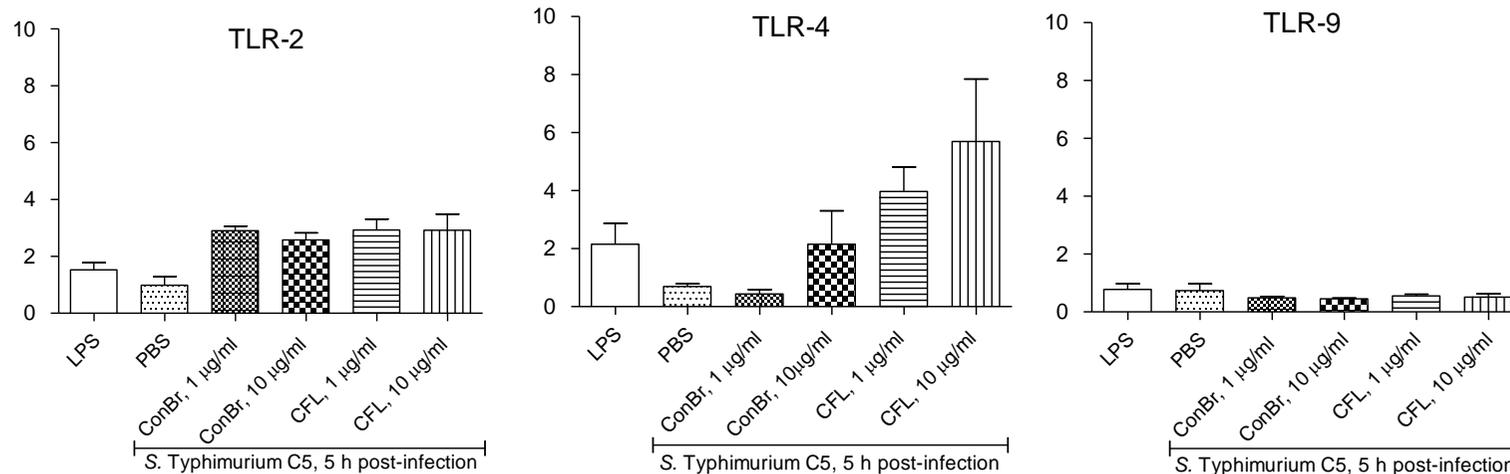


Fig. 5. Efeito de ConBr e CFL no controle da infecção por *Salmonella* através do tratamento curativo. A) Carga bacteriana intracelular; B) Viabilidade celular de macrófagos; C-H) Expressão gênica de citocinas. Os MØp foram infectados com *S. Typhimurium* por 5 h e então tratados com as lectinas ConBr e CFL por 24 h. * P < 0,05 por ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni, comparação com o grupo PBS.

Expressão de RNAm relativa à MØp não tratados e não infectados
(Variação relativa, normalizado com GAPDH)

MØp Infectados

Tratamento Preventivo



Tratamento Curativo

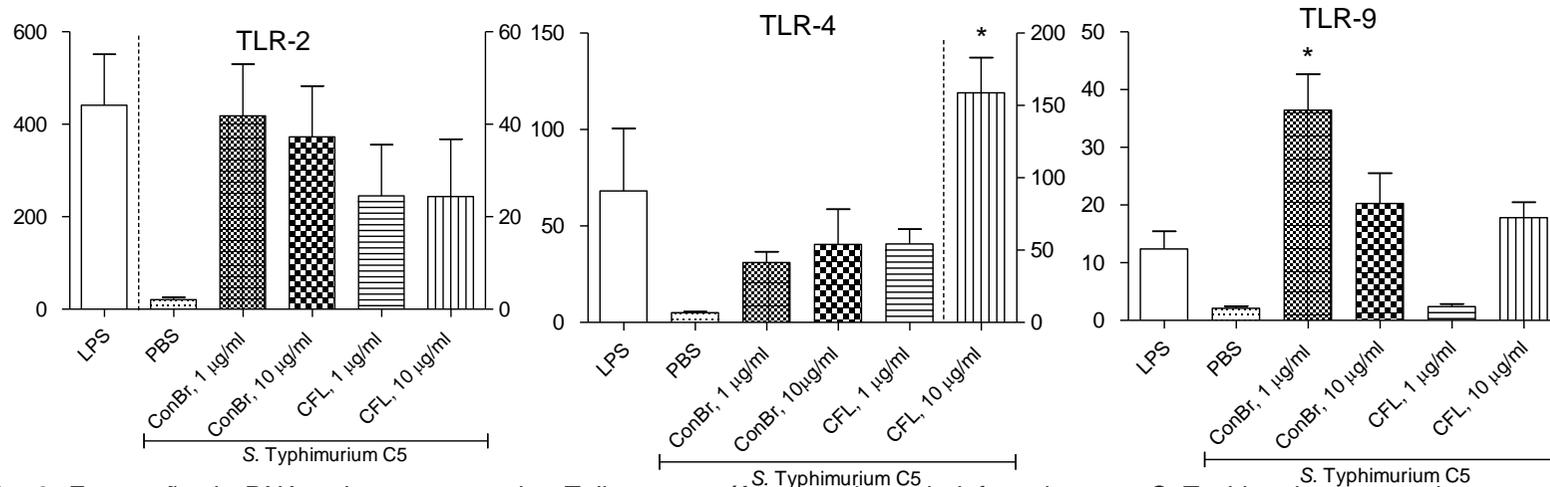


Fig. 6. Expressão de RNAm de receptores tipo Toll em macrófagos peritoneais infectados com *S. Typhimurium* e tratados com as lectinas ConBr e CFL (Tratamento preventivo e curativo). Lipopolissacarídeo (5 µg/ml) foi utilizado como controle. Os dados representam uma de pelo menos três medições independentes com resultados semelhantes.* P < 0,05 por ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni, comparação com o grupo PBS.

Tabela 1. Sequências dos iniciadores utilizados para PCRq em ensaios de expressão gênica.

Nome do Gene	Sequências de Primers
GAPDH murino (Controle interno)	F: ACC ACT TTG GCA TCG TGG AG R: GGG CCA TCC ACG GTC TTC TG
Interleucina-6 (IL-6)	F: TAATTCATATCTTCAACCAAGAGG R: TGGTCC TTAGCCACTCCTTC
Interleucina-1 β (IL-1 β)	F: TGAGCACCTTCTTTTCCTTCA R: TTGTCTAATGGGAACGTCACAC
Fator de Necrose Tumoral- α (TNF- α)	F: CTGTAGCCCACGTCGTAGC R: GGTTGTCTTTGAGATCCATGC
Interleucina- 12 (p35) (IL-12, p35)	F: ATG AAG CTC TGC ATC CTG CT R: CAG ATA GCC CAT CAC CCT GT
Interleucina- 12 (p40) (IL-12, p40)	F: AGC AGT AGC AGT TCC CCT GA R: AGT CCC TTT GGT CCA GTG TG
Interferon gamma (IFN- γ)	F: ACT GGC AAA AGG ATG GTG AC R: GCT GAT GGC CTG ATT GTC TT
Interleucina- 10 (IL-10)	F: CAT GGG TCT TGG GAA GAG AA R: AAC TGG CCA CAG TTT TCA GG
Receptor Toll-like 2 (TLR-2)	F: ATGTCGTTCAAGGAGGTGCG R: CTGACCGGTGATGCAATTCCG
Receptor Toll-like 4 (TLR-4)	F: GTTCTTCTCCTGCCTGACAC R: TCCAGCCACTGAAGTTCTGA
Receptor Toll-like 9 (TLR-9)	F: GGG CCC ATT GTG ATG AAC C R: CTT GGT CTG CAC CTC CAA CA
Enzima Óxido Nítrico Sintase Induzível (iNOs)	F: TGTGGCTACCACATTGAAGAA R: TCATGATAACGTT TCTGGCTCTT

CAPÍTULO II

**Receptores do tipo Toll-like estão envolvidos na ativação de macrófagos
causada pela lectina vegetal de *Cratylia argentea* (CFL)**

Receptores do tipo Toll-like estão envolvidos na ativação de macrófagos causada pela lectina vegetal de *Cratylia argentea* (CFL)

Batista JEC ^a, Rossi O ^b, Turlomousis P ^b, Bryant CE ^b, Ramos MV ^c, Mastroeni P ^{b*},
Lima-Filho JV ^{a*}

^a Departamento de Biologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife-PE, Brasil.

^b Departamento de Medicina Veterinária, Universidade de Cambridge, Cambridge, Reino Unido.

^c Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza-CE, Brasil.

*Autores correspondentes: José Vitor Lima-Filho, Rua Dom Manoel de Medeiros s/n, Departamento de Biologia, Lab. de Microbiologia e Imunologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife-PE Brasil, CEP 52171-900. E-mail: jose.mlimafo@ufrpe.br, Tel: + 55 31 81 33206312; Pietro Mastroeni, Departamento de Medicina Veterinária, Universidade de Cambridge, Madingley Road, Cambridge-Reino Unido, CB3 0ES. E-mail: pm274@cam.ac.uk, Tel: + 44 1223 765800.

Resumo

Background: Os receptores Toll-like 2 e 4 (TLR2/TLR4) desempenham um papel importante na proteção contra *Salmonella*. Moléculas agonistas de TLR4 ou antagonistas de TLR2 são promissores agentes terapêuticos no controle de infecção por esse patógeno. CFL, uma lectina glicose/manose de *Cratylia argentea*, é capaz de induzir a expressão gênica de citocinas e TLR2 e TLR4 e ativar macrófagos peritoneais, reduzindo significativamente a quantificação intracelular de *Salmonella*. No entanto, os mecanismos de ação envolvidos ainda não estão elucidados.

Proposta: Avaliar a participação dos receptores Toll-Like TLR2/TLR4 na ação imunomodulatória de CFL em macrófagos derivados da medula óssea (BMDM).

Métodos: Ensaios de citotoxicidade foram realizados em cultura de BMDM tratada com diferentes concentrações de CFL (5 - 320 µg/ml). Posteriormente, o perfil de expressão de citocinas inflamatórias foi analisado em BMDM obtidos de camundongos naive e duplo-nocautes para TLR2/TLR4 tratados com a lectina CFL. Após 1, 4, 8 e 24 h, a expressão gênica das citocinas TNF- α , IL-6 e IL-1 β foi avaliada.

Resultados: Não houve citotoxicidade em nenhuma das concentrações testadas. A concentração de 20 µg/ml de CFL foi capaz de induzir transcritos de RNAm para todas as citocinas após 4 h de exposição à BMDM naive. No entanto, os maiores níveis de expressão gênica foram observados após 8 h, quando houve o aumento de cerca de 100 vezes na expressão de IL-1 β , 82 vezes de IL-6 e 25 vezes de TNF- α . A interação entre a lectina CFL e os receptores foi avaliada em cultura de BMDMs TLR2/TLR4 duplo nocautes, que produziram níveis significativamente mais baixos de transcritos para IL-1 β , TNF- α e IL-6.

Conclusão: Os dados indicam que a lectina CFL foi capaz de ativar BMDM, o que resultou na expressão de citocinas pró-inflamatórias através da interação com os receptores TLR2/TLR4. Este é o primeiro relato da influência desses receptores na modulação de macrófagos pela lectina vegetal CFL.

Palavras-chave: CFL, *Cratylia argentea*, TLR2, TLR4, imunomodulador.

Introdução

A resposta imune inata é a primeira barreira de defesa contra as doenças infecciosas. Tal resposta tem início a partir do reconhecimento de moléculas conservadas do micro-organismo, denominada de padrões moleculares associados ao patógeno (PAMPs), pelos receptores de reconhecimento padrão (PRRs) presentes nas células da resposta imune. Os receptores Toll-like (TLRs) constituem a família de PRRs melhor caracterizada quanto aos seus ligantes, vias de sinalização e relevância funcional (Aderem e Ulevitch, 2000), e sua descoberta foi um importante marco para a imunologia (O'Neill et al., 2013). Além de sua ação essencial na resposta imune inata, os TLRs estão envolvidos no início da resposta imune adquirida, atuando no controle das funções relacionadas às células dendríticas (Iwasaki e Medzhitov, 2004).

O reconhecimento de ligantes microbianos pelos TLRs iniciará uma cascata de sinalização que resultará na produção de citocinas inflamatórias, quimiocinas e espécies reativas de oxigênio, componentes necessários para a eliminação do patógeno. Uma ampla variedade de ligantes microbianos são reconhecidos pelos TLRs, tais como peptídeos, lipídeos e ácidos nucleicos, entre outros. O TLR4 é capaz de reconhecer o lipopolissacarídeo (LPS) e sinalizar para células da imunidade inata, tais como macrófagos. Em resposta ao LPS, o TLR4 induz principalmente a secreção do fator de necrose tumoral alfa (TNF-alfa) (Lombardo et al., 2008). Já o TLR2 atua em conjunto com outros componentes da família TLR, incluindo TLR1 e TLR6. O TLR2 pode dimerizar com TLR6, reconhecendo lipopetideos di-acetilados tais como MALP-2, enquanto a dimerização com TLR1 interage com lipopeptideos tri-acetilados como Pam3CKS4 (Barrenschee et al., 2010; Funderburg et al., 2011). Agonistas de TLR4 ou antagonistas de TLR2 desempenham um papel essencial no controle de infecção por micro-organismos, incluindo *Salmonella Typhimurium* (Arpaia et al., 2011; Zhan et al., 2015).

Lectinas vegetais são proteínas capazes de se ligar reversivelmente à carboidratos específicos. Por essa razão, tais moléculas são capazes de interagir com carboidratos presentes na superfície de células imunológicas, resultando na produção de citocinas pró-inflamatórias e espécies reativas de oxigênio (Souza et al, 2013). Recentemente, a capacidade de interação entre as lectinas vegetais e os TLRs tem sido relatada (Silva e Correia, 2014). Por exemplo, Park et al. (2010) demonstraram que a lectina KML-C foi capaz de induzir a secreção do Fator de Necrose Tumoral

(TNF- α) através da ativação de macrófagos murinos mediada pela interação entre a lectina e o receptor Toll-like 4 (TLR4) e sua cascata de sinalização. Já a lectina ArtinM foi relatada como uma molécula agonista do receptor TLR2 ou seus heterodímeros, induzindo um perfil de citocinas consistente com sua habilidade em conter infecções causadas por patógenos intracelulares (Mariano et al., 2014).

CFL é uma lectina isolada das sementes da espécie *Cratylia argentea* (Desv.) Kuntze (Fabaceae) (sinônimo: *C. floribunda* e *Dioclea argentea*) glicose/manose específica e constituída de 236 aminoácidos (Cavada et al., 1999). Tal lectina tem sido estudada quanto ao seu potencial imunomodulatório em infecções experimentais por *Salmonella* Typhimurium. CFL foi capaz de modular a cascata de citocinas pró e anti-inflamatórias, bem como a produção de óxido nítrico após a infecção de camundongos suíços com uma cepa virulenta de *Salmonella enterica* Sor. Typhimurium (Silva et al., 2016). Além disso, pré-tratamentos dessa lectina foram capazes de reduzir a carga bacteriana nos órgãos-alvo da infecção e aumentar a taxa de sobrevivência dos animais. A partir desses resultados a influência da lectina CFL na ação imunomoduladora em nível celular foi investigada em cultura de macrófagos peritoneais infectados por *Salmonella*. CFL foi capaz de ativar macrófagos peritoneais e induzir a expressão gênica de citocinas e TLR-4, diminuindo significativamente a quantificação intracelular de *Salmonella* (Batista et al., 2017).

Moléculas agonistas dos receptores de reconhecimento padrão (PRRs), capazes de modular a resposta imunológica, têm sido alvo de pesquisa com foco no desenvolvimento de novas terapias que visam potencializar a resposta contra agentes infecciosos (Hancock et al., 2012). Desta forma, o presente trabalho avaliou a influência dos receptores TLR2/TLR4 na ativação de BMDM por tratamentos com a lectina CFL. Tal lectina foi capaz de interagir com esses receptores em macrófagos murinos, resultando na expressão de citocinas pró-inflamatórias. Em contrapartida, quando BMDM duplo nocautes para TLR2/TLR4 foram tratados com CFL nas mesmas condições experimentais, houve uma redução significativa na expressão de citocinas. Esses dados demonstraram que o potencial imunomodulatório da lectina é mediado pela interação entre CFL e tais receptores.

Material e Métodos

Obtenção da lectina CFL

As sementes da espécie *Cratylia argentea* (sinônimo: *C. floribunda* e *Dioclea argentea*), foram coletadas no Estado do Ceará (3.7319° S, 38.5267° W). A identidade taxonômica do material coletado foi confirmada pelo Herbário Prisco Bezerra da Universidade Federal do Ceará. Então, a lectina CFL foi extraída e purificada das sementes de *C. argentea*, seguindo o protocolo descrito por Oliveira et al. (1991). Para tanto, a lectina foi obtida através de cromatografia de afinidade utilizando a coluna de Sephadex G-50. A lectina foi dialisada em água destilada, liofilizada e submetida à eletroforese em gel de poliacrilamida a 12.5% (SDS-PAGE). Além disso, a proteína foi submetidas à degradação de Edman para determinação de suas sequências de aminoácidos (Shimadzu PPSQ). A contaminação por LPS da lectina foi descartada por meio do ensaio Endosafe-PTS (limite de detecção 0.01-10 EU/mL), seguindo o protocolo descrito pelo fabricante (Charles River-UK). Soluções estoque da lectina CFL foram preparadas em meio DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium), para uso nos experimentos.

Animais

Camundongos machos C57/BL6 naive e duplo nocaute para TLR2/TLR4 foram obtidos do Instituto Charles River e mantidos sob condições específicas isentas de patógenos no departamento de Medicina Veterinária da Universidade de Cambridge (Cambridge, Reino Unido). Os animais foram isolados em caixas com filtro e livre acesso a água e ração. Todos os procedimentos foram realizados após a aprovação do comitê de ética experimental da Universidade de Cambridge (PPL 80/2572).

Cultura celular de macrófagos derivados da medula óssea

Macrófagos derivados da medula óssea (BMDM) foram isolados a partir do fêmur e tíbia de camundongos C57/BL6 naive e duplo nocaute TLR2/TLR4, após serem sacrificados por deslocamento cervical. Para tanto, a medula óssea foi lavada assepticamente com meio de cultura celular DMEM. A suspensão de células obtida foi centrifugada, lavada e suspensa em DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino, 2 mM de glutamina, 100 µg de Streptomicina, 100 U de Penicilina e 20% do

sobrenadante de células L929 (uma linhagem celular produtora do fator estimulador de macrófagos murinos). Após, os macrófagos derivados foram semeados em placas de Petri descartáveis (Cook et al., 2007). O meio de cultura foi trocado a cada 3 dias e as células foram utilizadas nos ensaios entre 6 e 8 dias de cultura. Neste caso, as células foram suspensas em DMEM contendo baixa concentração de glicose (1000mg/mL), suplementado com 1% de soro fetal bovino, 2 mM de glutamina, 100 µg de estreptomicina e 100 U de penicilina, ajustadas na densidade de 2×10^5 ou 5×10^5 /poço e inoculadas em microplacas de 96 poços ou 24 poços, respectivamente.

Ensaio de citotoxicidade

Células BMDM foram quantificadas (2×10^5 células/poço), inoculadas em microplacas de 96 poços e incubadas *overnight* a 37 °C. Posteriormente, a lectina foi adicionada nos poços em concentrações variando de 5.0 a 320 µg/ml. Triton-X (0,5%) e PBS foram utilizados como controles. Após 24 h, a atividade metabólica das células foi avaliada pela redução de resazurina (0.15 mg/ml em PBS) a resofurina. Os resultados foram analisados em até 4 h por leituras em espectrofotômetro de fluorescência a 570 e 600 nm e expressos como porcentagem relativa à células não tratadas (grupo PBS). Foram realizados pelo menos dois experimentos independentes em triplicata.

Expressão gênica de citocinas

Os ensaios foram realizados em microplacas de 24 poços para obter o perfil de expressão de citocinas em macrófagos tratados com CFL. Agonistas dos receptores TLR4, o lipopolissacarídeo ultrapuro R515 (Enzo Life Sciences), e TLR2, pam3CSK4 (InvivoGen), foram utilizados como controles. Após os tratamentos, as células foram submetidas à lise com o reagente TRI (Sigma). O RNA total foi utilizado na construção do cDNA, utilizando a enzima M-MLV transcriptase reversa (Sigma). O cDNA produzido foi utilizado nas análises de expressão do Fator de Necrose Tumoral- α (TNF- α), Interleucina-6 (IL-6), e Interleucina-1 β (IL-1 β) por Real-Time RT-PCR (Sigma, SYBR-Green/Quantitativo RT-PCR Kit). Os genes GAPDH e Beta-actina murinos foram utilizados como controles internos. Os primers utilizados no presente trabalho seguiram as sequências descritas por Batista et al. (2016). A reação de PCR (20 µl) foi realizada como descrito a seguir: 40 ciclos a 95 °C por 35 s, 60 °C por 60 s

(Q series Rotor Gene - Qiagen). A fórmula a seguir foi utilizada para comparação dos níveis de expressão dos genes de interesse (G.I.) entre os grupos controle e experimental:

$$\Delta\Delta Ct = [(Ct \text{ G.I. Controle} - Ct \text{ GAPDH Controle}) - (Ct \text{ G.I. Experimental} - Ct \text{ GAPDH Experimental})]$$

Os resultados foram expressos em termos de variação usando a fórmula $2^{\Delta\Delta Ct}$.

Análise Estatística

A análise estatística entre os grupos experimentais e controle foi obtida por análises de variância (ANOVA) seguidas pelo teste de Bonferroni com intervalo de confiança de $P < 0.05$. Tais análises e a elaboração dos gráficos correspondentes foram realizadas no programa PRISMA versão 5.0.

Resultados e Discussão

Após a extração proteica das sementes de *Cratylia argentea*, o perfil homogêneo da lectina CFL foi verificado através de gel de proliacrilamida. Já o seu grau de pureza foi analisado através da sequência de aminoácidos da lectina, que apresentou a sequência N-terminal: ADTIVAVELDTYPNT. Tal dado corroborou com a sequência primária completa de CFL descrita por Cavada et al. (1999), confirmando a identidade proteica da lectina utilizada no presente trabalho. Neste estudo a lectina CFL não foi tóxica para os BMMs tratados com diferentes concentrações proteicas (Fig. 1). Ensaio anteriores de toxicidade demonstraram que CFL foi um potente moluscicida de *Biomphalaria glabrata*, cuja concentração letal para 90% dos moluscos (LC_{90}) foi de 50,3 $\mu\text{g/ml}$. Ainda, tal lectina foi tóxica contra o microcrustáceo *Artemia salina*, cuja LC_{90} foi de 7.68 ppm (dos Santos et al., 2010). Recentemente, o efeito citotóxico de CFL foi avaliado em macrófagos obtidos do lavado peritoneal de camundongos *Mus musculus*. Os resultados mostraram que a lectina não foi tóxica para tais células em concentrações similares às testadas no presente trabalho (Batista et al., 2017). Ademais, Barral-Neto et al., (1992) demonstraram que além de não ser tóxica, CFL ainda foi capaz de induzir a proliferação de células mononucleares do sangue periférico (PBMC), além de estimular a produção de IFN- γ .

O potencial imunomodulatório da lectina CFL tem sido previamente demonstrado pelo nosso grupo de pesquisa (Silva et al., 2016). Por exemplo, CFL aumentou a capacidade bactericida de macrófagos infectados por *Salmonella* Typhimurium e induziu aumento da expressão de citocinas pró-inflamatórias e dos receptores TLR2 e TLR4 (Batista et al., 2017). Considerando os resultados de citotoxicidade, inicialmente foi realizada uma triagem com a finalidade de verificar o perfil de expressão de citocinas induzidas por CFL. A lectina foi capaz de regular positivamente a expressão gênica de IL-1 β , TNF- α e IL-6 em BMDM nos tempos analisados. Entretanto, os maiores níveis de expressão foram observados após 8 h de exposição dos BMDM à lectina, que variaram de 258 vezes para IL-1 β , 233 vezes para IL-6 e 25 vezes para TNF- α .

Considerando os relatos do envolvimento dos TLRs na ação imunomodulatória por lectinas vegetais (Unitt e Hornigold, 2011), o papel dos receptores TLR2/TLR4 na ativação de citocinas pró-inflamatórias induzida por CFL foi avaliado. Os dados demonstram que houve redução significativa nos níveis de transcritos de RNAm das citocinas IL-1 β , TNF- α e IL-6 nos BMDM duplo nocaute TLR2/TLR4, quando comparados à expressão de células naive (Fig. 2). Tais resultados são de grande relevância, considerando que os TLRs desempenham um papel essencial para a resistência do hospedeiro contra micro-organismos. Esses receptores reconhecem regiões conservadas de patógenos (PAMPs) e iniciam uma cascata de sinalização, que resultará na proteção contra uma variedade de patógenos, incluindo *Salmonella* Typhimurium (Sivick et al., 2014). Por exemplo, Arpaia et al. (2011) avaliaram a influência dos receptores duplo nocautes TLR2/TLR4 em BMDM infectados por *Salmonella* Typhimurium através da produção de óxido nítrico (NO). Esse estudo revelou que BMDM nocautes foram altamente susceptíveis a esse patógeno intracelular, produzindo baixas concentrações de NO em comparação aos BMDM naive.

Finalmente, lectinas vegetais têm sido descritas como moléculas agonistas de TLRs, capazes de interagir com diferentes receptores (Silva e Correia, 2014). Sugere-se que essa propriedade esteja relacionada com os sítios de reconhecimento de carboidrato da lectina e a apresentação desses sítios em diferentes TLRs (Unitt e Hornigold, 2011). Tal hipótese foi confirmada por Mariano et al. (2014) em sua pesquisa onde mostraram a relevância biológica da interação direta entre a lectina

ArtinM e N-glicanos do receptor TLR2. Tal estudo demonstrou que macrófagos nocautes para TLR2 produziram níveis reduzidos significativos de IL-12 e IL-10 em resposta ao tratamento com a lectina quando comparados com macrófagos naive. Além disso, a ligação entre TLR2 e a lectina foi inibida quando ArtinM foi pré-incubada com seu carboidrato específico, a manotriose. Considerando a fundamental importância da sinalização mediada pelos TLRs para o controle de infecções, novas moléculas capazes de modular a resposta imunológica via TLR têm sido alvos para o desenvolvimento de novos terapicos, potencializando a eficácia de vacinas e antibióticos contra agentes infecciosos (Hancock et al., 2012; Maisonneuve et al., 2014). Nesse contexto, o presente trabalho apresenta uma nova potencialidade para a lectina CFL como agonista de TLR, com vistas ao desenvolvimento de fármacos capazes de modular a imunidade antimicrobiana contra patógenos, tais como *Salmonella*

Conflitos de interesse

Os autores não possuem conflitos de interesse a declarar.

Agradecimentos

Este estudo foi financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (Programa de Pesquisador Visitante especial/CNPq). Os autores agradecem ainda à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de doutorado para o primeiro autor e à Universidade de Cambridge por ceder o laboratório para execução do presente trabalho.

Referências

- Aderem, A., Ulevitch, R.J., 2000. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature*. 406, 782-787.
- Arpaia, N., Godec, J., Lau, L., Sivick, K.E., McLaughlin, L.M., Jones, M.B., Dracheva, T., Peterson, S.N., Monack, D.M., Barton, G.M. 2011. TLR signaling is required for *Salmonella typhimurium* virulence. *Cell*. 144, 675-88.

- Barral-Neto, M., Santos, S.B., Barral, A., Moreira, L.I., Santos, C.F., Moreira, R.A., Oliveira, J.T., Cavada, B.S., 1992. Human lymphocyte stimulation by legume lectins from the Diocleae tribe. *Immunol. Invest.* 21, 297-303.
- Barrenschee, M., Lex, D., Uhlig, S. 2010. Effects of the TLR2 agonists MALP-2 and Pam3Cys in isolated mouse lungs. *PLoS One.* 16, e13889.
- Batista, J.E.C., Ralph, M.T., Vaz, R.V., Souza, P.F.C., Silva, A.F.B., Nascimento, D.C.O., Souza, L.T., Ramos, M.V., Mastroeni, P., Lima-Filho, J.V. 2017. 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.* 25, 52-60.
- Cavada, B.S., Nogueira, N.A.P., Freitas, C.M.S.A., Grangeiro, T.B., Ramos, M.V., Thole, H.H., Rouge, P. Calvete, J.J., 1999. Primary structure and kinetic interaction with glycoproteins of the lectin from seeds of *Cratylia floribunda*. *Pro. Pep. Lett.* 6, 27-34.
- Cook, P., Totemeyer, S., Stevenson, C., Fitzgerald, K.A., Yamamoto, M., Akira, S., Maskell, D.J., Bryant, C.E. 2007. Salmonella-induced SipB-independent cell death requires Toll-like receptor-4 signalling via the adapter proteins Tram and Trif. *Immunol.* 122, 222-229.
- dos Santos, A.F., Cavada, B.S., da Rocha, B.A., do Nascimento, K.S., Sant'Ana, A.E., 2010. Toxicity of some glucose/mannose-binding lectins to *Biomphalaria glabrata* and *Artemia salina*. *Bioresour Technol.* 101, 794-798.
- Funderburg, N.T., Jadowsky, J.K., Lederman, M.M., Feng, Z., Weinberg, A., Sieg, S.F. 2011. The Toll-like receptor 1/2 agonists Pam₃CSK₄ and human β -defensin-3 differentially induce interleukin-10 and nuclear factor- κ B signalling patterns in human monocytes. *Immunol.* 134, 151–160.
- Hancock R.E., Nijnick, A., Philpott, D.J., 2012. Modulating immunity as a therapy for bacterial infections. *Nat. Rev. Microbiol.* 10, 243-254.

- Iwazaki, A., Medzhitov, R. 2004. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nature Immunol.* 5, 987-995.
- Lombardo, E., Alvarez-Barrientos, A., Maroto, B., Boscá, L., Knaus, U.G. 2007. TLR4-Mediated Survival of Macrophages Is MyD88 Dependent and Requires TNF- α Autocrine Signalling¹. *J Immunol.* 178, 3731-3739.
- Maisonneuve, C., Bertholet, S., Philpott, D.J., De Gregorio, E. 2014. Unleashing the potential of NOD- and Toll-like agonists as vaccine adjuvants. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 111, 12294-12299.
- Mariano, V.S., Zorzetto-Fernandes, A.L., Silva, T.A., Ruas, L.P., Nohara, L.L., Almeida, I.C., Roque-Barreira, M.C. 2014. Recognition of TLR2 N-Glycans: Critical Role in ArtinM Immunomodulatory Activity. *PLoS One.* 9, e98512.
- Oliveira, J.T.A., Cavada, B.S., Moreira, R.A., 1991. Isolation and partial characterization of a lectin from *Cratylia floribunda* Mart. Seeds. *Ver. Bras. Bot.* 14, 61-66.
- O'Neill, L.A.J., Golenbock, D., Bowie, A.G., 2013. The history of Toll-like receptors — redefining innate immunity. *Nature.* 13, 453-460.
- Park, H-J., Hong, J-H., Kwon, H-J., Kim, Y., Lee, K-H., Kim, J-B., Song, S.K. 2010. TLR4-mediated activation of mouse macrophages by Korean mistletoe lectin-C (KML-C). *Biochem Biophys Res Commun.* 396, 721-725.
- Silva, A.F.B., Matos, M.P., Ralph, M.T., Silva, D.L., de Alencar, N.M., Ramos, M.V., Lima-Filho, J.V., 2016. Comparison of immunomodulatory properties of mannose-binding lectins from *Canavalia brasiliensis* and *Cratylia argentea* in a mice model of *Salmonella* infection. *Int. Immunopharmacol.* 31, 233-238.
- Silva, L.C.M., Correia, M.T.S., 2014. Plant lectins and Toll-like receptors: implications for therapy of microbial infections. *Front. Microbiol.* 5, 1-3.
- Sivick, K.E., Arpaia, N., Reiner, G.L., Lee, B.L., Russel, B.R., Barton, G.M. Toll-like Receptor-Deficient Mice Reveal How Innate Immune Signaling Influences *Salmonella* Virulence Strategies. *Cell Host Microbe.* 15, 203-213.

Souza, M.A., Carvalho, F.C., Ruas, L.P., Ricci-Azevedo, R., Roque-Bandeira, M.C. 2013. The immunomodulatory effect of plant lectins: a review with emphasis on ArtinM properties. *Glycoconj J*, 30, 641–657.

Unitt, J., Hornigold, D., 2011. Plant lectins are novel Toll-like receptor agonists. *Biochem. Pharmacol.* 81, 1324-1328.

Zhan, R., Han, Q., Zhang, C., Tian, Z., Zhang, J. 2015. Toll-Like receptor 2 (TLR2) and TLR9 play opposing roles in host innate immunity against *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infection. *Infect Immun.* 83, 1641-1649.

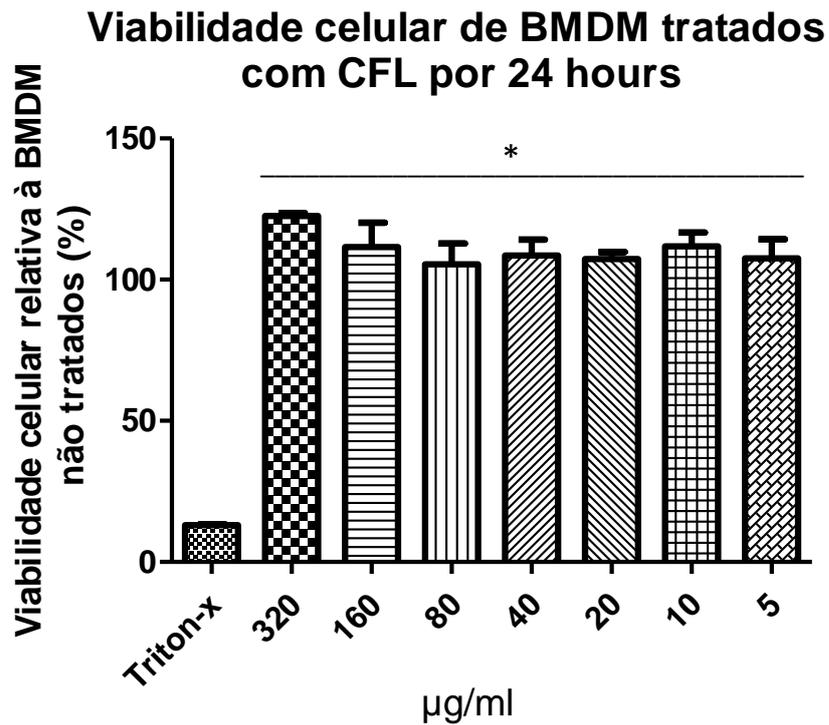
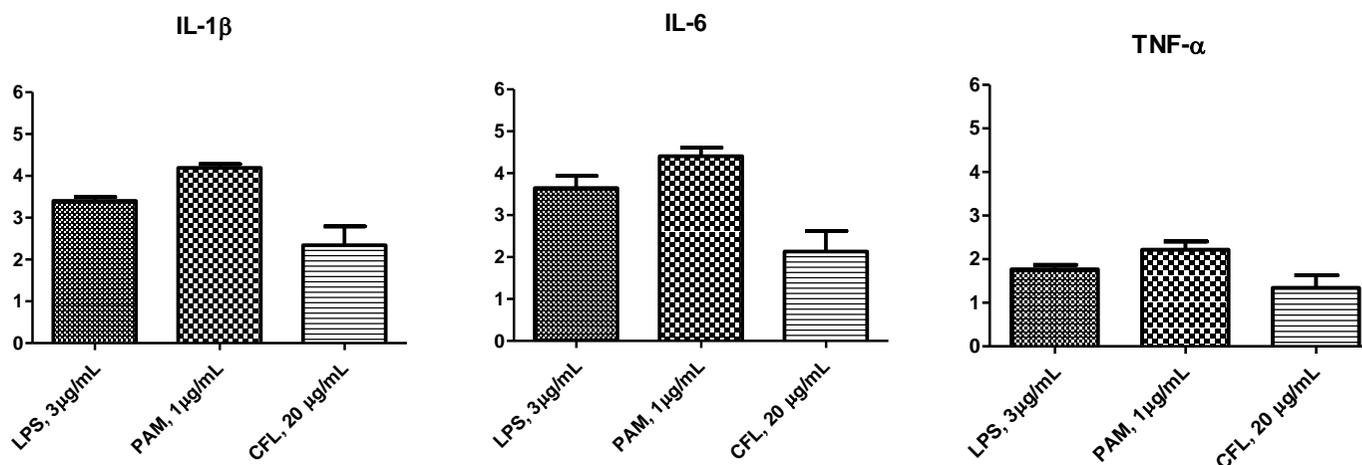


Fig. 1. Viabilidade celular após a exposição de BMDM à lectina de *Cratylia argentea* (CFL). Os macrófagos foram incubados com CFL em placas de 96 poços com diferentes concentrações durante 24 h. A viabilidade celular foi avaliada através da medição da redução de resazurina em resofurina. Os resultados foram analisados até 4 h por leituras espectrofotométricas a 570 e 600 nm, e expressos como percentagem em relação às células não tratadas (grupo PBS). Triton-X (0,05%) foi utilizado como controle técnico. * $P < 0,05$ através ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni, comparação com Triton-X no mesmo período de tempo. Comparações entre as doses não apresentaram diferenças significativas.

Expressão de RNAm relativa à BMDM não tratados
(Expressão relativa em Log10, normalizado com GAPDH)

BMDM naive



BMDM duplo nocaute TLR2/TLR4

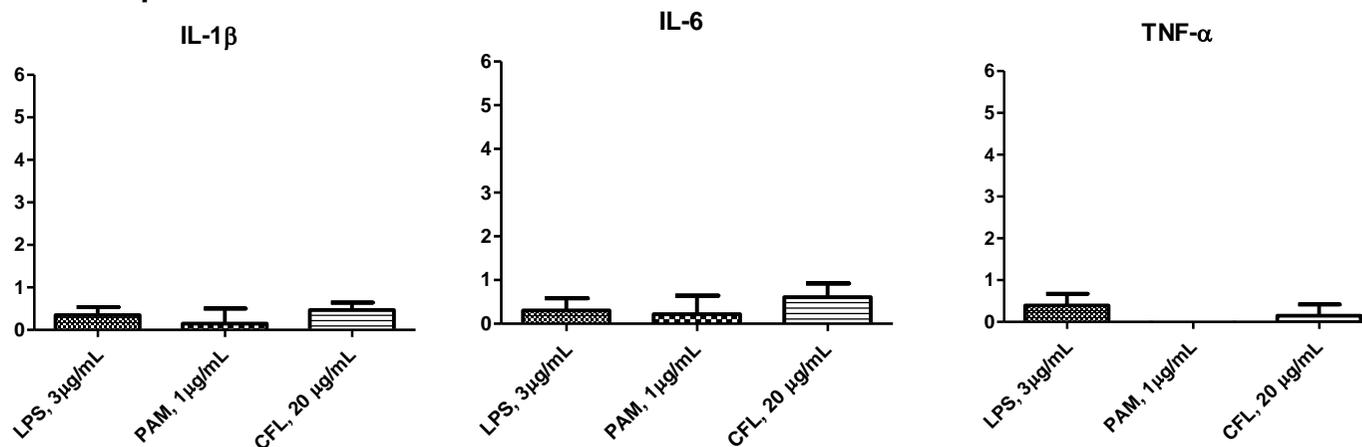


Fig. 2. Expressão gênica de citocinas em macrófagos derivados da medula óssea naiva e duplo nocaute TLR2/TLR4 tratados com a lectina vegetal CFL (20 μ g/ml) após 8 h de exposição. Lipopolissacarídeo (3 μ g/ml) e Pam3CSK4 (1 μ g/ml) foram utilizados como controles. Os dados representam um de pelo menos dois experimentos independentes com resultados similares.

CAPÍTULO III

Efeito imunoadjuvante das lectinas vegetais CFL (*Cratylia argentea*) e ConBr (*Canavalia brasiliensis*) frente ao antígeno vacinal Vi de *Salmonella* Typhi

Efeito imunoadjuvante das lectinas vegetais CFL (*Cratylia argentea*) e ConBr (*Canavalia brasiliensis*) frente ao antígeno vacinal Vi de *Salmonella* Typhi

Batista JEC ^a, Vaz RV ^a, Ramos MV ^b, Mastroeni P ^{c*}, Lima-Filho JV ^{a*}

^a Departamento de Biologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife-PE, Brasil.

^b Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza-CE, Brasil.

^c Departamento de Medicina Veterinária, Universidade de Cambridge, Cambridge, Reino Unido.

*Autores correspondentes: José Vitor Lima-Filho, Rua Dom Manoel de Medeiros s/n, Departamento de Biologia, Lab. de Microbiologia e Imunologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife-PE Brasil, CEP 52171-900. E-mail: jose.mlimafo@ufrpe.br, Tel: + 55 31 81 33206312; Pietro Mastroeni, Departamento de Medicina Veterinária, Universidade de Cambridge, Madingley Road, Cambridge-Reino Unido, CB3 0ES. E-mail: pm274@cam.ac.uk, Tel: + 44 1223 765800.

Resumo

Background: O antígeno polissacarídico Vi é uma das opções vacinais licenciadas que tem sido utilizada com sucesso limitado na imunização contra a febre tifoide. As lectinas vegetais CFL e ConBr são proteínas com potencial imunomodulatório capazes de induzir a expressão de citocinas pró-inflamatórias e TLRs, demonstrando efeito benéfico em modelos experimentais de infecção por *Salmonella*.

Proposta: Avaliar o potencial adjuvante *in vivo* das lectinas ConBr e CFL co-administradas ao antígeno Vi purificado em camundongos Swiss.

Métodos: Os animais foram imunizados com uma preparação contendo antígeno Vi (10 µg) co-administrado com 100 µg de CFL ou ConBr, pela via intraperitoneal (i.p.). No 15º dia, os animais foram inoculados com a dose reforço. Após 30 dias, a coleta de sangue dos animais de todos os grupos foi realizada para análise do título de anticorpos IgG anti-Vi.

Resultados: As lectinas CFL e ConBr não foram capazes de induzir o aumento no título de anticorpos específicos IgG anti-Vi, já que não houve diferença estatística significativa em relação aos grupos imunizados somente com antígeno Vi purificado.

Conclusão: Os dados sugerem que as lectinas vegetais CFL e ConBr não possuem potencial adjuvante quando associadas a antígenos T-independentes.

Palavras-chave: CFL, ConBr, Adjuvante vacinal, antígeno Vi, *Salmonella*.

Introdução

Lectinas vegetais são moléculas capazes de se ligar reversivelmente a carboidratos específicos. Dentre as diversas atividades biológicas atribuídas a essas proteínas, está o potencial imunomodulatório (Souza et al., 2013). Esse potencial está relacionado à capacidade de interação dessas proteínas com carboidratos presentes na superfície de células do sistema imune, podendo resultar na transdução de sinal e consequente produção de citocinas (Lam; Ng, 2011). Nesse contexto, substâncias capazes de modular a resposta imunológica representam uma alternativa promissora para o desenvolvimento de novos fármacos. Tais substâncias, também denominadas de adjuvantes terapêuticos, são geralmente agonistas de receptores Toll-Like e Nod-Like e podem atuar nos mecanismos imunológicos naturais e adaptativos do hospedeiro, aprimorando a eficácia de antígenos vacinais (Hancock et al., 2010; Maisonneuve et al., 2014).

As lectinas vegetais de *Cratylia argentea* (CFL) e *Canavalia brasiliensis* (ConBr) têm sido investigadas quanto ao seu potencial imunomodulatório em diferentes modelos experimentais (Batista et al., 2017; Silva et al., 2016). Recentemente, tais lectinas foram capazes de conferir proteção à macrófagos murinos peritoneais contra a infecção por *Salmonella* através da indução de citocinas pró-inflamatórias com envolvimento dos receptores TLR4 e 9 e, em menor grau, TLR2, demonstrando propriedades imunomoduladoras benéficas para o controle de células infectadas por cepa virulenta de *Salmonella* (Batista et al., 2017). Tais dados sugerem que essas moléculas representam uma alternativa promissora para o uso na terapia adjuvante contra *Salmonella*. O gênero *Salmonella* inclui patógenos intracelulares facultativos capazes de sobreviver dentro de fagócitos. Tal gênero possui diversas espécies de importância médica, incluindo *Salmonella enterica* Sor. Typhi, agente etiológico da febre tifoide (Buckle et al., 2012).

A febre tifoide é uma doença febril aguda responsável por cerca de 33 milhões de casos a cada ano em todo o mundo, resultando em 500 mil óbitos (Garmory et al., 2002). Tal doença está fortemente presente em locais que possuem saneamento básico precário, ocorrendo principalmente no sudeste da Ásia devido à alta prevalência de resistência à antibióticos nessa região (Parry et al., 1998). Atualmente, existem duas vacinas amplamente licenciadas para uso contra a febre tifoide, a vacina

oral Ty21a e a vacina polissacarídica do Vi purificado (Jackson et al., 2015). No entanto, tais vacinas não demonstram alto poder imunogênico, possuem tempo de proteção limitado, além de não induzirem proteção eficaz contra a febre tifoide em crianças menores de 2 anos (Guzman et al., 2006). Nesse contexto, novas formulações vacinais que confirmam um maior tempo de proteção imunológica estão sendo pesquisadas (Maclennan et al., 2014). Considerando a ação benéfica demonstrada pelas lectinas vegetais ConBr e CFL contra infecções causadas por *Salmonella*, o presente trabalho avaliou o potencial adjuvante de ambas as lectinas na imunização contra a febre tifoide.

Material e Métodos

Lectinas

As sementes das espécies *Cratylia argentea* e *Canavalia brasiliensis* foram coletadas no Ceará. Após, a identificação do material coletado foi realizada pelo Herbário Prisco Bezerra da Universidade Federal do Ceará. As lectinas CFL e ConBr foram extraídas e purificadas das sementes de *C. argentea* e *Canavalia brasiliensis*, respectivamente, através de cromatografia de afinidade utilizando coluna de Sephadex G-50 e seguindo as metodologias descritas por Oliveira et al (1991) e Moreira (1984).

Animais

Camundongos suíços fêmeas de 4-6 semanas de idade (peso 30 g \pm 5) foram obtidos do Laboratório Nacional Agropecuário (LANAGRO, PE, Brasil). Os animais foram mantidos com acesso livre à água e ração padrão (Purina, Pauline, SP, Brasil). Os ensaios do presente trabalho somente foram executados após a aprovação do comitê de ética experimental da Universidade Federal Rural de Pernambuco (Número da licença: 126/2015).

Imunização

Para verificar o efeito adjuvante das lectinas ConBr e CFL, os animais (n=5/grupo) foram imunizados com o antígeno Vi (10 μ g) co-administrado com CFL (100 μ g) ou ConBr (100 μ g) via intraperitoneal (i.p.). Outro grupo foi administrado com tampão fostato salino estéril (PBS) e utilizado como controle. Após 15 dias da primeira

imunização, os animais foram inoculados com a dose reforço. Após 30 dias, a coleta de sangue dos animais de todos os grupos foi realizada.

Determinação do título de anticorpos IgG anti-Vi

A análise do título de anticorpos foi realizada através de ELISA indireto seguindo protocolo descrito por Janis et al. (2011). A leitura da absorbância a 492 nm foi realizada em espectrofotômetro para detecção de anticorpos IgG anti-Vi. Todas as amostras foram analisadas em triplicata.

Análise Estatística

A análise estatística entre os grupos experimentais e controle foi obtida por análises de variância (ANOVA) seguidas pelo teste de Bonferroni com intervalo de confiança de $P < 0.05$. Tais análises e a elaboração dos gráficos correspondentes foram realizadas no programa PRISMA versão 5.0.

Resultados e Discussão

Para obter sucesso em formulações vacinais é imprescindível que haja a indução e manutenção da resposta humoral protetora a longo prazo. Entretanto, poucos antígenos são capazes de induzir tal resposta, incluindo o antígeno vacinal Vi (Jackson et al., 2015). Tal antígeno é caracterizado como um polímero linear de 1, 4(2-deox)-2-N-ácido acetilgalacturônico variável com 60 a 70% de unidades monoméricas O-acetiladas na posição C3 que tem sido utilizado com sucesso limitado na proteção contra a febre tifoide (Szu et al., 1991). Essa limitação ocorre já que antígenos polissacarídicos induzem resposta independente de células T, possuem baixo potencial imunogênico, não induzem memória imunológica a longo prazo e são ineficazes em crianças com menos de 2 anos.

Neste trabalho as lectinas ConBr e CFL foram avaliadas como moléculas adjuvantes potencializadoras da resposta imunológica desenvolvida pelo antígeno Vi através da produção de anticorpos IgG anti-Vi, já que tais anticorpos são essenciais na resposta humoral contra *Salmonella*, sendo a principal classe de anticorpos produzida em estudos com o antígeno Vi (Losonsky et al., 1987). Os resultados obtidos demonstraram que tais lectinas não possuem efeito adjuvante frente ao

antígeno vacinal Vi de *S. Typhi*, já que a análise do título de anticorpos específicos de IgG anti-Vi demonstrou que não houve diferença estatística significativa entre os grupos imunizados com as lectinas co-administradas ao antígeno Vi quando comparado ao grupo imunizado somente com o antígeno Vi purificado (Fig. 1).

Moléculas que demonstram potencial na terapia adjuvante têm sido conjugadas junto ao antígeno Vi com a finalidade de potencializar a memória imunológica a longo prazo e elicitar resposta dependente de células T (Maclennan et al., 2014). Tais vacinas conjugadas são capazes de induzir títulos significativamente elevados de anticorpos IgG anti-Vi quando comparadas à administração do antígeno Vi purificado ou misturado a proteínas (Micoli et al., 2011). Isso sugere que não foi possível verificar o aumento no título de anticorpos no presente trabalho já que preparações de ConBr ou CFL misturadas ao antígeno Vi foram utilizadas no protocolo de imunização ao invés de conjugá-las ao antígeno. Vacinas conjugadas demonstram alta eficácia, segurança, poder imunogênico e são eficazes em crianças menores de 2 anos, grupo onde a incidência da doença é comprovadamente alta (Sinha et al., 1999; Szu et al., 2013).

Embora as lectinas de *C. argentea* (CFL) e *C. brasiliensis* (ConBr) tenham recentemente demonstrado potencial adjuvante terapêutico promissor como imunomoduladores capazes de induzir a expressão citocinas pró-inflamatórias e TLRs, atuando no controle de células infectadas por *Salmonella* (Batista et al., 2017), no presente trabalho tais lectinas não demonstraram efeito imunoadjuvante quando co-administradas ao antígeno vacinal Vi de *S. Typhi*.

Conflitos de interesse

Os autores não possuem conflitos de interesse a declarar.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (Programa de Pesquisador Visitante especial/CNPq) pelo financiamento da pesquisa e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de doutorado para o primeiro autor.

Referências

- Batista, J.E.C., Ralph, M.T., Vaz, R.V., Souza, P.F.C., Silva, A.F.B., Nascimento, D.C.O., Souza, L.T., Ramos, M.V., Mastroeni, P., Lima-Filho, J.V. 2017. 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*. 25, 52-60.
- Buckle, G.C., Walker, C.L.F., Black, R.E. 2012. Typhoid fever and paratyphoid fever: Systematic review to estimate global morbidity and mortality for 2010. *J. Global Health*. 2, 1-9.
- Garmory, H.S., Brown, K.A., Titball, R.W. 2002. *Salmonella* vaccines for use in humans: present and future perspectives. *FEMS Microbiol. Rev.* 26, 339-353.
- Guzman, C.A., Borsutzky, S., Griot-Wenk, M., Metcalfe, I.C., Pearman, J., Collioud, A., Favre, D., Dietrich, G. 2006. Vaccines against typhoid fever. *Vaccine*. 24, 3804-3811.
- Hancock R.E., Nijnick, A., Philpott, D.J., 2012. Modulating immunity as a therapy for bacterial infections. *Nat. Rev. Microbiol.* 10, 243-254.
- Jackson, B.R., Iqbal, S., Mahon, B. 2015. Updated Recommendations for the Use of Typhoid Vaccine — Advisory Committee on Immunization Practices, United States, 2015. *MMWR*. 64, 305-308.
- Janis, C., Grant, A.J., McKinley, T.J., Morgan, F.J.E., John, V.F., Houghton, J., Kingsley, R.A., Dougan, G., Mastroeni, P. 2011. *In Vivo* Regulation of the Vi Antigen in *Salmonella* and Induction of Immune Responses with an *In Vivo*-Inducible Promoter. 79, 2481- 2488.
- Lam, S.K., Ng, T.B. 2011. Lectins: production and practical applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 89, 45-55.
- Losonsky, G.A., Ferreccio, C., Kotloff, K.L., Kaintuck, S., Robbins, J.B., Levine, M.M. 1987. Development and evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for

serum Vi antibodies for detection of chronic *Salmonella* typhi carriers. J. Clin. Microbiol. 25, 2266-2269.

Maclennan, C.A., Martin, L.B., Micoli, F. 2014. Vaccines against invasive *Salmonella* disease: current status and future directions. Hum. Vaccin. Immunother. 10, 1478-93.

Maisonneuve, C., Bertholet, S., Philpott, D.J., De Gregorio, E. 2014. Unleashing the potential of NOD- and Toll-like agonists as vaccine adjuvants. Proc. Natl. Acad. Sci. 111, 12294-12299.

Micoli, F., Rondini, S., Pisoni, I., Proietti, D., Berti, F., Costantino, P., Rappuoli, R., Szu, S., Saul, A., Martin, L.B. 2011. Vi-CRM197 as a new conjugate vaccine against *Salmonella* Typhi. Vaccine. 29, 712-720.

Moreira, R.A., Cavada, B.S., 1984. Lectin from *Canavalia brasiliensis* (Mart.). Isolation, characterization and Behaviour during germination. Biol. Plantarum 26, 113-120.

Oliveira, J.T.A., Cavada, B.S., Moreira, R.A., 1991. Isolation and partial characterization of a lectin from *Cratylia floribunda* Mart. Seeds. Ver. Bras. Bot. 14, 61-66.

Parry, C., Wain, J., Chinh, N.T., Vinh, H., Farrar, J.J. 1998. Quinolone-resistant *Salmonella* typhi in Vietnam. Lancet. 351, 1289.

Silva, A.F.B., Matos, M.P., Ralph, M.T., Silva, D.L., de Alencar, N.M., Ramos, M.V., Lima-Filho, J.V., 2016. Comparison of immunomodulatory properties of mannose-binding lectins from *Canavalia brasiliensis* and *Cratylia argentea* in a mice model of *Salmonella* infection. Int. Immunopharmacol. 31, 233-238.

Sinha, A., Sazawal, S., Kumar, R., Sood, S., Reddaiah, V.P., Singh, B., Rao, M., Naficy, A., Clemens, J.D., Bhan, M.K. 1999. Typhoid fever in children aged less than 5 years. The Lancet. 354, 734-737.

Souza, M.A., Carvalho, F.C., Ruas, L.P., Ricci-Azevedo, R., Roque-Bandeira, M.C. 2013. The immunomodulatory effect of plant lectins: a review with emphasis on ArtinM properties. Glycoconj J, 30, 641–657.

Szu, S.C., Li, X.R., Stone, A.L., Robbins, J.B. 1991. Relation between Structure and Immunologic Properties of the Vi Capsular Polysaccharide. *Infect. Imm.* 59, 4555-4561.

Szu, S.C. 2013. Development of Vi conjugate — a new generation of typhoid vaccine. *Expert Rev Vaccines.* 12, 1273-1286.

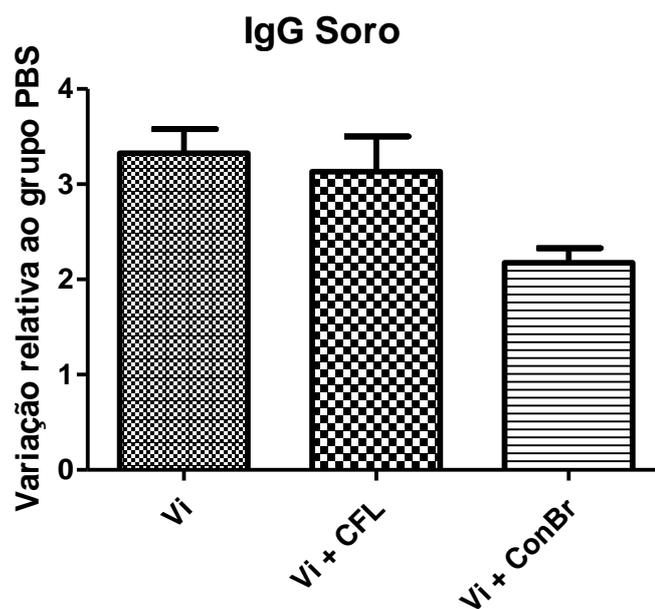


Fig. 1. IgG sérica anti-Vi quantificada por ELISA indireto. Os animais foram imunizados inicialmente e receberam a dose reforço no 15^o dia. Após 30 dias da dose inicial, o título de anticorpos foi avaliado no soro dos animais. Grupo Vi: animais imunizados com 10 µg de Vi purificado; Vi + CFL: animais imunizados com 100 µg de CFL + 10 µg de antígeno Vi; Vi + ConBr: animais imunizados com 100 µg de ConBr + 10 µg de antígeno Vi. Os resultados foram analisados por leituras espectrofotométricas a 492 nm e expressos como variação relativa entre o grupo experimental e o grupo controle PBS. * P <0,05 através ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni, comparação com o grupo Vi imunizado no mesmo período de tempo. Comparações entre os grupos de animais imunizados e o grupo controle (PBS) apresentaram diferenças significativas.

5. CONCLUSÃO

As lectinas ConBr e CFL demonstram propriedades imunomoduladoras protetoras no controle de macrófagos infectados por *S. Typhimurium*. Tal proteção é conferida através da modulação dessas células por meio da expressão de citocinas pró-inflamatórias e TLRs. Entretanto, tais lectinas não são capazes de potencializar a resposta protetora conferida pelo antígeno vacinal Vi. De maneira geral, os resultados sugerem que as lectinas representam uma perspectiva promissora para o desenvolvimento de novos fármacos contra *Salmonella*.

6. ANEXOS

ANEXO 1: ARTIGO PUBLICADO NA REVISTA PHYTOMEDICINE-QUALIS A2



Contents lists available at ScienceDirect

Phytomedicine

journal homepage: www.elsevier.com/locate/phyomed



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



JEC Batista^a, MT Ralph^a, RV Vaz^a, PFC Souza^a, AB Silva^b, DCO Nascimento^a, LT Souza^a, MV Ramos^b, P Mastroeni^{c,*}, JV Lima-Filho^{a,*}

^aDepartment of Biology, Federal Rural University of Pernambuco, Recife-PE, CEP 52171-900 Brazil

^bDepartment of Biochemistry and Molecular Biology, Federal University of Ceará, Fortaleza-CE, Brazil

^cDepartment of Veterinary Medicine, University of Cambridge, Cambridge, CB3 0ES United Kingdom

ARTICLE INFO

Article history:
Received 30 May 2016
Revised 23 November 2016
Accepted 11 December 2016

Keywords:
C. brasiliensis
C. argentea
Mannose-binding
Immunomodulators

ABSTRACT

Background: Plant lectins have long been used in biomedical research as immunomodulators against tumor cells and microbial infections.

Purpose: To test the ability of plant lectins ConBr (*Canavalia brasiliensis*) and CFL (*Cratylia argentea*) to activate antimicrobial and immunomodulatory activities of murine peritoneal macrophages (pMØ) infected with a virulent strain of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (STM).

Methods: We incubated pMØ with non-toxic amounts of ConBr and CFL either before (preventive schedule) or after (curative schedule) exposure to STM.

Results: In uninfected pMØ, ConBr and CFL greatly increased levels of mRNA transcripts for IL-1 β , TNF- α and IL-6 and the inducible nitric oxide synthase (iNOS), but not IL-10 and IL-12. Exposure to naïve splenocytes of culture supernatants of pMØ previously stimulated with CFL resulted in expression of IL-12 and IFN- γ . Both preventive and curative treatment schedules significantly reduced the intracellular load of *Salmonella*. Experiments in infected macrophages exposed to lectins in the preventive schedule showed that mRNA transcripts for IL-6 and TNF- α were increased by CFL, whereas ConBr enhanced IL-12 (subunit p40). In the curative schedule, CFL induced significant expression of IL-12 (p40) whereas ConBr enhanced expression IL-1 β and TNF- α genes. The lectin treatments did not influence on iNOS expression in pMØ infected with STM C5 regardless of the treatment schedule. Curative treatments with CFL increased approximately 130-fold expression of TLR-4 whilst expression of TLR-9 was increased by treatments with ConBr.

Conclusion: We conclude that lectins ConBr and CFL have immunomodulatory properties that are bene-