



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA

RAYZA MIRELLA ALVES DA SILVA

**POTENCIAL IMUNOMODULADOR DA LECTINA DE *Canavalia*
brasiliensis EM MODELOS DE INFECÇÃO CAUSADAS POR
*Listeria monocytogenes***

Recife
2018

RAYZA MIRELLA ALVES DA SILVA

Trabalho de conclusão de curso
apresentado à Universidade Federal
Rural de Pernambuco, como parte
das exigências para a obtenção do
título de Bacharel em Ciências
Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. José Vitor Moreira
Lima Filho

Co-orientador: Me. Lethicia Souza
Tavares

Recife
2018

RAYZA MIRELLA ALVES DA SILVA

Monografia apresentada ao
curso de Bacharelado em
Ciências Biológicas da
Universidade Federal Rural de
Pernambuco. Como requisito
para obtenção do título de
Bacharel . Defesa e aprovação
em 23- 08- 2018

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

S586p Silva, Rayza Mirella Alves.

Potencial imunomodulador da lectina de *canavalia brasiliensis* em modelos de infecção causadas por *listeria monocytogenes* / Rayza Mirella Alves Silva Pinheiro.
– Recife, 2018.
40 f.: il.

Orientador(a): José Vitor Moreira Lima Filho.

Coorientador (a): Lethicia Souza Tavares.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento em Ciências Biológicas, Recife, BR-PE, 2018.

Inclui referências.

1. Doenças transmissíveis 2. Listeriose 3. Lectinas 4. Imunoterapia
5. Microbiologia I. Lima Filho, José Vitor Moreira, orient. II. Tavares, Lethicia Souza, orient. III. Título

CDD 574

Dedico este trabalho a toda minha família, em especial:

Aos meus avos, Marlene Cunha, Severino e Maria Luiza.

Aos meus pais, Marlene Alves da Cunha e José Gui.

A minha irmã Jessica Samila.

AGRADECIMENTOS

A Universidade Federal Rural de Pernambuco, ao Departamento de Biologia, pelas oportunidades fornecidas.

Ao meu orientador Dr. José Vitor Moreira Lima Filho, por ter me dado a oportunidade de ser sua orientanda. Agradeço por toda confiança e por toda experiência proporcionada durante o estágio no laboratório de microbiologia e imunologia e por me orientar neste trabalho, agradeço pelas palavras de incentivo e conforto. Serei eternamente grata.

A minha co-orientadora Lethicia Souza Tavares por toda ajuda para desenvolver esse trabalho, agradeço ainda pelas suas orientações, sugestões e sua amizade.

As integrantes do Laboratório de microbiologia e imunologia (LAMIM) por me acolherem tão bem, pelos momentos de alegria e aprendizado. Pela ajuda nos exaustivos experimentos. Betty, Bruna, Ingrydt, Lethicia, Paula. Em especial as grandes amigas Jacqueline, que me adotou como filha acadêmica e se dispôs a ensinar todas as técnicas laboratoriais, agradeço por todas as dúvidas esclarecidas, por todo ensinamento e pela sua amizade que levarei comigo sempre e a Renata que sempre estendeu a mão para ajudar, ensinar e debater resultados quando nada se encaixava, agradeço por toda colaboração, toda preocupação. Obrigada gente!

À minha querida mãe Marlene Alves da Cunha e minha irmã Samila Alves por tudo que elas sempre representaram em todos os momentos da minha vida. Não tenho palavras para descrever o amor que tenho por essas mulheres. À meu pai José Gui e meu cunhado Nielson Melo que tenho como irmão, obrigado por todo apoio. Eu amo vocês!

Aos meus avós ausentes Severino e Maria Luiza e presente Marlene Cunha meu eterno agradecimento por todos os ensinamentos, por todo cuidado e toda proteção, eu amo vocês.

A Deus por me dar forças para vencer as dificuldades, sabedoria para enfrentar os momentos difíceis e esperança para acreditar em dias melhores. Obrigado por me guiar e orientar em todos os caminhos que decido a seguir. Por me conceder o privilégio de ter saúde e estudar para poder realizar este trabalho.

Muito Obrigada !!

Rayza Mirella Alves da Silva

RESUMO

A listeriose é uma doença infecciosa, transmitida por alimentos contaminados pela bactéria *Listeria monocytogenes*, que pode causar abortos e meningoencefalite em animais e seres humanos. Antibióticos nem sempre são efetivos no controle da doença, de forma que o uso de imunoterapêuticos torna-se uma estratégia interessante para combate à doença. A lectina ConBr, por exemplo, extraída das sementes da leguminosa *Canavalia brasiliensis* (feijão-bravo-do-Ceará) possui atividades imunomoduladora, antimicrobiana e cicatrizante já reportadas na literatura. Diante disso, objetivou-se, com este trabalho, avaliar o potencial da lectina ConBr como imunoterapêutico no controle da infecção causada pela *L. monocytogenes*. Para tanto, foram realizados testes *in vitro* com cultura de macrófagos tratados com a lectina e infectados por *L. monocytogenes* a fim de avaliar: citotoxicidade da lectina (ConBr); quantificar bactérias intracelulares e sobrevivência de macrófagos mediante a infecção. Também foram realizados ensaios *in vivo*, de forma a investigar a influência da lectina ConBr na depuração de *L. monocytogenes* do fígado e baço e quantificação dos leucócitos presentes no sangue dos animais experimentais. Os resultados demonstraram que a lectina produziu um estímulo anti-inflamatório nos animais que foi negativo para a eliminação da bactéria *L. monocytogenes*, bem como reduziu o número de leucócitos totais quando comparado ao grupo controle. Concluiu-se que, apesar da lectina ConBr não ter contribuído no controle da infecção por *L. monocytogenes*, há potencial para o controle de processos inflamatórios derivados de infecções sistêmicas.

Palavras chave: ConBr, Listeriose, imunoterapêutico

ABSTRACT

Listeriosis is an infectious disease transmitted by food contaminated with the bacterium *Listeria monocytogenes*, which can cause miscarriages and meningoencephalitis in animals and humans. Antibiotics are not always effective in controlling the disease, so the use of immunotherapeutics becomes an interesting strategy to combat the disease. Conbr lectin, for example, extracted from the seeds of the *Canavalia brasiliensis* (Brave-Fava beans) has immunomodulatory, antimicrobial and cicatrizant activities already reported in the literature. The objective of this study was to evaluate the potential of the ConBr lectin as an immunotherapeutic in the control of *L. monocytogenes* infection. For this, in vitro tests with culture of macrophages treated with the lectin and infected by *L. monocytogenes* were carried out in order to evaluate: lectin cytotoxicity (ConBr); quantify intracellular bacteria and survival of macrophages through infection. In vivo assays were also performed to investigate the influence of ConBr lectin on the clearance of *L. monocytogenes* from the liver and spleen and quantification of leukocytes present in the blood of experimental animals. The results showed that the lectin produced an anti-inflammatory stimulus in the animals that was negative for the elimination of the *L. monocytogenes* bacterium, as well as reduced the total leukocyte count when compared to the control group. It was concluded that, although ConBr lectin did not contribute to the control of *L. monocytogenes* infection, there is potential for the control of inflammatory processes derived from systemic infections.

Key words: ConBr, Listeriosis, immunotherapeutic

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Visão geral da *C.brasiliensis*.....13
- Figura 2** - Macrófagos tratados com ConBr nas concentrações de 1µg/mL e 10µg/mL durante 24 horas, tendo como controle o grupo macrófagos não tratados.....27
- Figura 3** - Quantificação de bactérias intracelular, em macrófagos tratados com ConBr nas concentrações de 1µg/mL e 10µg/mL.....28
- Figura 4** - Viabilidade celular de macrófagos tratados com ConBr nas concentrações de 1µg/mL e 10µg/mL e infectados com *L. monocytogenes*.....29
- Figura 5** - Contagem de bactérias no baço e fígado de animais infectados por *Listeria monocytogenes* e tratados com PBS, Conbr 1mg e Conbr 10mg durante o período de 5 dias.....30
- Figura 6** – Contagem total de leucócitos no sangue de camundongos pré-tratados com Conbr no modelo de peritonite induzido por *Listeria monocytogenes*.....31

LISTA DE TABELA

Tabela 1. Contagem diferencial de leucócitos no sangue de animais controle (grupo PBS + *L.monocytogenes*) e animais experimentais tratados com ConBr1 mg/kg e ConBr10 mg/kg e infectados com *L.monocytogenes*.....32

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. REVISÃO DE LITERATURA	13
2.1 Lectinas vegetais	14
2.1.1 A lectina de <i>Canavalia brasiliensis</i>	15
2.2 <i>Listeria monocytogenes</i>	16
2.2.1 Listeriose	17
2.2.2 Modelo de infecção.....	18
2.3 Resposta imunológica	19
2.3.1 Resposta imunológica contra infecções bacterianas.....	21
3 OBJETIVOS	22
4. MATERIAIS E MÉTODOS	23
4.1 Obtenção das proteínas de <i>Canavalia brasiliensis</i>	23
4.2 O micro- organismo	23
4.3 Os animais	24
4.4 Obtenção dos macrófagos.....	24
4.5 Viabilidade de macrófagos	25
4.6 Quantificação de bactérias intracelulares.....	25
4.7 Desenho experimental	25
4.8. Quantificação bacteriana nos órgãos alvo de infecção.....	26
4.9 Contagem total e diferencial de leucócitos.....	26
4.10 Análise estatística	26
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	27
6. CONCLUSÃO	33
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	33

1. INTRODUÇÃO

Durante séculos, as doenças infecciosas permanecem entre as principais causas de morte e deficiência em todo o mundo. Grande ênfase é dada para essas doenças, devido às propriedades evolutivas associadas ao elevado potencial de mutação dos microrganismos patogênicos. As infecções bacterianas são consideradas um problema à saúde humana, em particular aquelas de origem alimentar. Segundo o Ministério da Saúde, existem mais de 250 tipos de doenças transmitidas por alimentos (DTA), tendo importante causa de morbidade e mortalidade em todo o mundo. Seus sintomas vão desde náuseas, diarreia e alterações extra intestinais, atingindo órgãos como rins, fígado, baço, dentre outros.

A listeriose é uma infecção bacteriana causada pela ingestão de alimentos contaminados pela bactéria *Listeria monocytogenes*, tais como peixe cru, frango mal cozido, alguns queijos e vegetais mal higienizados. Embora os surtos de listeriose sejam relativamente raros (0,1 a 10 casos por ano por milhão de pessoas, dependendo do país e região), essa infecção representa importante risco à saúde pública devido à alta taxa de mortalidade. Gestantes, idosos, recém-nascidos e pacientes imunocomprometidos são considerados grupos de alto risco com mortalidade de 20 a 30%. Seu mecanismo de infecção é silencioso e *L. monocytogenes* consegue invadir, sobreviver e reproduzir-se dentro de células sem ativar uma resposta do sistema imunológico.

A pesquisa e o desenvolvimento de novas moléculas para serem utilizadas no controle de infecções têm crescido muito nos últimos anos. O uso de produtos naturais como adjuntos terapêuticos vem despertando o interesse da comunidade científica. Em meio a essas moléculas bioativas, as lectinas vegetais expressam uma grande capacidade imunomoduladora. A Conbr, lectina extraída das sementes da leguminosa *Canavalia brasiliensis*, é caracterizada pela sua afinidade aos carboidratos D- glucose / D-manose (MOREIRA, 1984). Devido a essa interação, desempenham diversos efeitos biológicos, tais como: atividades imunomoduladora, antimicrobiana e

cicatrizante (SILVA, 2009). No presente estudo, modelos de infecção com *Listeria monocytogenes*, *in vitro* e *in vivo*, são utilizados para avaliar a influência de ConBr no controle da infecção.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Lectinas vegetais

Na natureza, as lectinas encontram-se distribuídas em diversos organismos vivos. Nos vegetais, essas moléculas estão presentes nos cotilédones e endospermas das sementes. A principal fonte são as sementes de leguminosas, correspondendo a cerca de 2 a 10% do total de proteína das sementes (DIAZ et al., 1999). Podem ainda ser isoladas, em menor quantidade, da folha, grão de pólen, raízes, frutos, cascas, rizomas e caule (ARLETE et al., 2009)

O termo “lectina” tem origem do latim “legere” que significa “para selecionar” e foi proposto por William Boyd em 1954, sendo definidas como proteínas de origem não imunológica, ou seja, não são produtos da resposta imune (VAN DAMME et al., 2008; LAN e NG, 2011). Essas promovem ligações de reconhecimento com fundamental importância em processos biológicos, como infecções virais e bacterianas. Tais proteínas integram parte de um grupo de moléculas estruturalmente heterogêneo que é capaz de reconhecer sítios específicos, ligar-se reversivelmente a compostos contendo carboidratos e aglutinar células e glicoconjugados, sem induzir qualquer modificação química. (GOLDSTEIN et al., 1980).

Os estudos sobre lectinas tiveram início no século XIX, com a descoberta de que alguns extratos de plantas eram tóxicos para homens e animais, quando Bruylants e Vennerman em 1884 analisaram a toxicidade da semente de *Abrus precatorius* (MOREIRA et al., 1990). Em seguida, outros pesquisadores deram início a uma série de pesquisas a fim de identificar o potencial dessas proteínas. Em 1888, Hermam Stillmark observou que extratos do feijão castor (*Ricinus communis*) promoviam a aglutinação de células

vermelhas do sangue (atividade hemaglutinante) ampliando assim os estudos e aplicações dessas proteínas (GABOR et al., 2001).

As lectinas de leguminosas são as mais estudadas e caracterizadas até o momento quanto às diversas atividades biológicas (BARBOSA et al., 2001). Dentre elas, incluem-se aglutinação celular, apoptose, inibição do crescimento celular, atividade imunomoduladora, antifúngica, antiviral e inseticida (LIMA, 2007; PENG et al., 2009). O uso de lectinas oferece diversas vantagens, levando em conta sua alta estabilidade e suas distintas especificidades, possibilitando assim sua aplicação como ferramenta para preparativos em bioquímica, biologia celular, imunologia e áreas afins (SHARON & LIS, 2004).

2.1.1 A lectina da *Canavalia brasiliensis* (ConBr)

As leguminosas do gênero *Canavalia*, possuem aproximadamente 70 espécies de origem tropical, incluindo a *Canavalia brasiliensis*, uma trepadeira que apresenta folhas alternadas e trifolioladas, com flores de coloração roxa e pétalas bem perfumadas. Popularmente conhecida no Brasil como feijão bravo- do- Ceará (GUEDES et al., 2009), *C. brasiliensis* apresenta distribuição geográfica bastante ampla e, devido a capacidade de tolerar períodos de estiagem, está presente no cerrado brasileiro, no México, Caribe, Paraguai e Argentina (SAUER, 1964).

Figura 1- Visão geral da *C. brasiliensis*



Fonte: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br> Acesso em: 20/10/2017

A lectina ConBr, extraída e isolada da *C. brasiliensis*, é caracterizada pela sua afinidade aos carboidratos D-glucose/ D-manose (MOREIRA, 1990). Tal afinidade favorece a interação com o revestimento de carboidratos complexados a proteínas (glicoproteínas) e lipídios (glicolipídeos) presentes em várias células. A partir do conhecimento dessa interação, diversos efeitos biológicos são atribuídos a essa lectina, dentre as atividades imunomoduladora, antimicrobiana, cicatrizante (SILVA, 2009), neuroprotetora (RUSSI et al., 2012) ativação *in vivo* de linfócitos T e indução de apoptose celular (BARBOSA et al., 2001) e redução da glicemia sanguínea (MESQUITA et al., 2005).

2.2 *Listeria monocytogenes*

Pertencente à família Listeriaceae, a bactéria *Listeria monocytogenes* é amplamente distribuída em diversos ambientes como amostras de plantas, solo, água doce, água salgada, esgoto, vegetais em decomposição, pó ambiental, além de alimentos crus e de origem animal (KONEMAN et. al., 2001). A primeira descrição *L. monocytogenes* foi em 1926, quando Murray e seus colaboradores isolaram uma bactéria Gram-positiva em forma de bastonete não esporulante, causadora de um surto epizootico em coelhos e cobaias. Após observar que tal bactéria infectava os monócitos, os pesquisadores a denominaram de *Bacterium monocytogenes*. Alguns anos mais tarde, Pirie isolou a bactéria a partir de um roedor selvagem no Norte da África e nomeou-a de *Listerella hepatolytica* (em homenagem a Lord Lister). Por fim, em 1940, chegou-se à conclusão que *Bacterium monocytogenes* e *Listerella hepatolytica* eram o mesmo microrganismo, adaptando-se, então, a designação de *Listeria monocytogenes* (RYSER & MARTH, 2007).

L. monocytogenes é caracterizada por ser um bacilo curto, anaeróbio facultativo, não formador de cápsulas e esporos (CRUZ et al. 2008), cujas dimensões variam entre 0,5 e 2 µm de comprimento e 0,5 µm de diâmetro (Ryser & Marth, 2007). A cinética de crescimento desse microrganismo é dependente da interação de fatores extrínsecos, tais como: temperatura e pH. Com relação à temperatura, *L. monocytogenes* cresce em faixas que variam entre 1 e 45 °C, tendo uma temperatura ótima de crescimento de 30 a 37°C (SEELIGER e JONES, 1987). Uma influência direta da temperatura sobre

L. monocytogenes é em relação com a mobilidade desse micro-organismo. Quando em faixa de temperatura estreita de 20 a 25 °C, *L. monocytogenes* possui flagelos peritricos, que lhe dão uma característica de mobilidade. Porém, a formação dos flagelos é reduzida a uma temperatura de 37 °C (SEELIGER e JONES, 1987; FARBER E PETERKIN, 1991).

Como muitas outras bactérias, *L. monocytogenes* tem crescimento ótimo a um pH próximo da neutralidade. Na ausência de outros fatores limitantes de crescimento, as populações conseguem crescer em ambientes entre 5,6 e 8,0 (RYSER & MARTH, 2007). Aparentemente, as células de *L. monocytogenes* recuperam-se melhor do stress provocado por um meio alcalino do que por um meio ácido ou por um choque osmótico, que provocam alterações importantes nos seus parâmetros de crescimento. Os limites mínimos de pH que permitem o crescimento dessa bactéria também dependem do tipo de ácido (PINTADO, 2009). A taxa de crescimento de *L. monocytogenes* na presença de ácidos orgânicos varia consideravelmente com o tipo, concentração do ácido e com o pH do meio (BUCHANANA et al., 1994). As peculiaridades supracitadas são características que habilitam *L. monocytogenes* a crescerem em ambientes variados (FARBER e PETERKIN, 2000).

L. monocytogenes é classificada como bactéria oportunista, pois a possibilidade de causar patogenicidade em seres humanos depende, principalmente, das condições imunológicas dos indivíduos afetados (CRUZ et al., 2008).

Como muitas outras bactérias, *L. monocytogenes* tem crescimento ótimo a um pH próximo da neutralidade. Na ausência de outros fatores limitantes de crescimento, as populações conseguem crescer em ambientes entre 5,6 e 8,0 (RYSER & MARTH, 2007). Aparentemente, as células de *Listeria monocytogenes* recuperam-se melhor do stress provocado por um meio alcalino do que por um meio ácido ou por um choque osmótico, que provocam alterações importantes nos seus parâmetros de crescimento. Os limites mínimos de pH que permitem o crescimento dessa bactéria também dependem do tipo de ácido (PINTADO, 2009). A taxa de crescimento de *L. monocytogenes* na presença de ácidos orgânicos varia consideravelmente com o tipo, concentração do ácido e com o pH do meio (BUCHANANA et

al., 1993). As peculiaridades supracitadas, são características que habilitam *L. monocytogenes* a crescer em ambientes variados (FARBER e PETERKIN, 2000).

2.2.1 Listeriose

A causa mais comum de infecção por *L. monocytogenes* é de origem alimentar, denominada listeriose. A doença é esporádica e observada durante todo o ano, com pico de ocorrência nos meses mais quentes (MURRAY, 2000). A *L. monocytogenes* é o agente patogênico mais recente causador de surtos que marcaram a humanidade (RYSER & MARTH, 2007). Embora *L. monocytogenes* tenha sido reconhecida como um patógeno humano na década de 1920, o primeiro surto de listeriose de origem alimentar só foi reconhecido no início dos anos 80 (JACKSON 2016).

A infecção provocada por *L. monocytogenes* depende principalmente do estado imunitário do hospedeiro, da virulência da estirpe e da quantidade de células bacterianas ingeridas (DELGADO, 2008). Dessa forma, é capaz de infectar todos os grupos populacionais humanos, porém, problemas mais graves são relatados em mulheres grávidas, recém-nascidos, idosos e indivíduos imunossuprimidos (RAMASWAMY, 2007).

A listeriose pode acometer humanos e animais. Sua forma associada a animais, especialmente em ruminantes, manifestam-se clinicamente como encefalite ou como infecção uterina (e consequente aborto) (NIGHTINGALE et al., 2004, 2005). Em seres humanos, *L. monocytogenes* apresenta tropismo pelo sistema nervoso e atravessa a barreira hemato-encefálica, podendo causar meningite e encefalite (HOF et al., 1997).

Existem dois tipos de listeriose causadas por *L. monocytogenes*: a não invasiva e a invasiva. Diferente das infecções alimentares causadas por outros patógenos, a listeriose invasiva não causa sintomas gastrointestinais em humanos. Isso porque, quando são ingeridas, *L. monocytogenes* migram para o intestino onde realizam a colonização. Posteriormente, essas bactérias são

fagocitadas por macrófagos, multiplicando-se e espalham-se pelo organismo (KATHARIOU, 2002). Assim, *L. monocytogenes* fica protegida dos mecanismos de defesa do hospedeiro, o que limita a terapia com drogas (HOF, 2006). As manifestações clínicas da listeriose em adultos são decorrentes, principalmente, de infecções no sistema nervoso central (SNC) como meningite e encefalite, além de outras infecções como endocardite, peritonite, pneumonia e osteomielite (FARBER & PERTEKIN, 1991).

Em gestantes os sintomas da listeriose invasiva apresentam-se como um quadro gripal. A infecção pode ser transmitida da mãe para o feto, via placentária capaz de provocar aborto no final do segundo trimestre ou ocasionar sequelas para o nascituro (KETO-TIMONEN, 2008). Segundo o Centro de Doenças Controle e Prevenção (2011), as gestantes fazem parte do segundo grupo mais suscetível de contrair a listeriose, correspondendo a cerca de 17%. Indivíduos com condições imunossupressoras, como portadores do vírus HIV, malignidades tratadas com quimioterapia, diabetes mellitus e insuficiência renal, aumentam o risco da listeriose invasiva a 69% (CDC, 2011; SKOGBERG, 1992).

Sobre a forma não invasiva, há a ocorrência via fecal-oral pela ingestão de alimentos contaminados. Esta, resulta em gastroenterite febril acompanhada de vômitos e diarreia (CRUZ 2008, JACKSON 2016). Embora a listeriose acometa principalmente indivíduos imunossuprimidos, nos anos 90, uma nova forma da infecção não invasiva foi detectada em pessoas saudáveis, resultando em sintomas gastrointestinais suaves (CRUZ, 2008).

2.2.3 Modelo de infecção

A patogenia de *L. monocytogenes* resulta da capacidade de invadir, sobreviver e reproduzir dentro de células de tecido animal, incluindo células não fagocíticas e glóbulos branco (LECUIT, 2007). Quando realizam a invasão celular, *L. monocytogenes* multiplicam-se dentro da célula hospedeira evitando uma resposta do sistema imune humoral, escapando também da resposta imune celular por dispersar através da passagem célula-célula (VAZQUEZ, 2001). Devido a esse mecanismo, o aparecimento dos sintomas é tardio dificultando o diagnóstico.

Após a ingestão, inicia-se a colonização no trato gastrointestinal. Esta se dá pela penetração através da superfície basolateral de células epiteliais intestinais ou invasão das placas de Peyer, através das células M. Posteriormente, há o deslocamento a partir dos linfonodos mesentéricos para baço e fígado (CRUZ, 2008; LECUIT, 2007).

O ciclo de infecção se inicia com a adesão da bactéria na superfície da célula eucariótica. Em seguida, ocorre a penetração por meio do mecanismo de fagocitose ou, no caso de células não-fagocíticas, pela interação de moléculas ligantes presentes na superfície da bactéria. Essas moléculas são as internalinas A e B (InlA e InlB), que desempenham um papel importante na ligação com receptores encontrados na superfície da célula do hospedeiro (CRUZ 2008; MENGAUD *et al.*, 1996).

Dessa forma, a bactéria é internalizada pela célula, sendo inicialmente envolvida por um vacúolo. Pouco tempo depois, através de fosfolipazes e hemolisina, a *L. monocytogenes* inicia o processo de ruptura da membrana fagossômica (GLOMSKI *et al.*, 2002), impedindo que o fagossomo fusione com o lisossomo para poder estabelecer o seu ciclo de infecção (CRUZ, 2008). No citoplasma, as bactérias se multiplicam passando a utilizar glicose -1-fosfato para se replicar eficientemente (GLOMSKI *et. al.*, 2002) A *L. monocytogenes* é capaz de expressar vários fatores de virulência, dentre eles, a proteína ActA, que é encontrada na superfície da bactéria assim que elas escapam do fagossomo. Essas proteínas migram para um dos polos, dando origem a “cauda” de até 40 µm de comprimento, que permite a propulsão da bactéria (KOCKS *et al.*, 1992). A movimentação favorece a difusão da bactéria célula-célula, sem ficar exposta a defesas extracelular do hospedeiro (VÁSQUEZ-BOLAND *et al.*, 2001).

2.3 Resposta imunológica

Frequentemente o sistema imunológico está exposto a interações complexas com diversos patógenos. Visando a defesa do hospedeiro, as respostas imunológicas desenvolvem-se numa sequência de etapas específicas envolvendo moléculas, células e órgãos (ABBAS,2011).

A primeira linha de defesa do organismo envolve a imunidade inata, caracterizada por resposta rápida à infecção, eliminando os microrganismos que invadem o hospedeiro (ABBAS, 2008). Os componentes do sistema imunológico natural incluem barreiras físicas, químicas, biológicas, moléculas solúveis, e células efectoras como neutrófilos, macrófagos, células dendríticas, células *natural killer* (NK), basófilos, mastócitos e eosinófilos (ABBAS, 2008; MURRAY, 2000; CRUVINEL, 2010). A imunidade inata está presente em todos os indivíduos, independente de contato prévio com antígenos, e não se altera qualitativa ou quantitativamente após o contato (CRUVINEL, 2010). A ativação da resposta imune inata se dá pelo reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPS), que são moléculas comumente encontradas na superfície de microrganismos, por receptores de reconhecimento padrão (PRR) encontrados na superfície de células (MEDZHITO et al., 1997).

Os neutrófilos são os leucócitos mais abundantes no sangue periférico, tendo papel importante na fase inicial da reação inflamatória (CRUVINEL, 2010). Devido à presença de substâncias bactericidas como: espécies reativas de oxigênio e nitrogênio e enzimas proteolíticas são capazes de eliminar os microrganismos. (ALVES-FILHO et al., 2005; ALVES-FILHO et al., 2008) . Os neutrófilos promovem a liberação de quimiocinas e citocinas ativando outros neutrófilos e aumentam o recrutamento de células do sistema imune para o sítio de infecção (DINARELLO, 2009).

As células do sistema dos fagócitos mononucleares originam-se na medula óssea, percorrem no sangue e podem ser ativadas em diversos tecidos (ABBAS, 2008). A primeira célula a entrar no sangue periférico é chamada de monócito, estes constituem cerca de 3-8 % dos leucócitos, têm 10 a 15 µm de diâmetro e quando migram para os tecidos, essas células maturam e tornam-se macrófagos, dessa forma são capazes de fagocitar os microrganismos (ABBAS, 2008; CRUVINEL, 2010). Responsáveis por fagocitar elementos estranhos e secretar citocinas, também atuam como células apresentadoras de antígenos (APCs), para ativação de linfócitos T e B. São capazes de responder tão rapidamente quanto os neutrófilos, contudo permanecem por mais tempo no local da inflamação, pois são capazes de sofrer divisões celulares no sítio de inflamação (ABBAS, 2008; CRUNIVEL, 2010).

As células dendríticas apresentam longas projeções membranosas que facilitam o mecanismo de fagocitose. São responsáveis por capturar e apresentar antígenos aos linfócitos T, desempenhando papel importante por conectar elementos da resposta inata para a resposta adquirida (ABBAS, 2008; CRUVINEL, 2010). As células natural killer (NK), constituem cerca de 5% a 20% das células mononucleares do sangue (ABBAS, 2008). Morfologicamente apresentam tamanho maior que os linfócitos T e B, atuando de forma diferente das células da imunidade adaptativa por reagir rapidamente contra vírus e bactérias (JOBIM, 2008). São capazes de reconhecer e exterminar células infectadas, além de secretar citocinas inflamatórias e ativar macrófagos através da produção de interferon γ (IFN- γ) (ABBAS, 2008)

Quando a resposta inata não é eficiente para conter a infecção, mecanismos específicos são desencadeados contra o invasor por meio da imunidade adquirida, que depende da ativação de células especializadas (os linfócitos) e moléculas solúveis produzidas por linfócitos. Possui característica de produzir memória imunológica específica, resposta especializada e tolerância aos componentes próprios do organismo, que é mediada pela presença, principalmente, de linfócitos e células apresentadoras de antígenos (APC) (DELVES, 2000).

2.3.2 Resposta imunológica contra infecções bacterianas

Doenças infecciosas podem ser causadas por vírus, fungos, bactérias, protozoários e príons (BRASIL, 2010). Nas últimas décadas, as infecções bacterianas têm se destacado devido ao elevado potencial de mutação genética que as bactérias apresentam, dessa forma podem evoluir para infecções sistêmicas induzindo respostas inflamatórias (FAUCI et al., 2001) (OPAL, 2003).

Os receptores de reconhecimento de padrão (PRR) fazem parte da resposta imune inata e são os primeiros componentes a detectar a invasão no hospedeiro por patógenos (KAWAI, 2010). Os PRRs são capazes de reconhecer os padrões moleculares associados ao patógeno (PAMPs) e os padrões moleculares associados ao dano (DAMPs) induzindo assim a ativação

e recrutamento de células do sistema imune inato e a produção de citocinas pró-inflamatórias, tais como Interleucina-1 β (IL-1 β), TNF- α e Interferon-gama (IFN- γ) (JONG et al., 2010). As primeiras células a serem recrutadas para o local da infecção são os neutrófilos. Fagócitos infectados secretam IL-12 que age sobre células NK que, uma vez ativas, secretam IFN- γ para ativação de macrófagos e células dendríticas (RUBY et al., 2012). Macrófagos secretam mediadores da inflamação, como TNF, IL-1, IL-6, IL-8 e óxido nítrico, que trabalham em conjunto ou independentemente, para estimular respostas imunes específica e não-específica contra a invasão (FRACASSO, 2008).

Apesar da importância da resposta imune inata, a resposta imunológica mediada por células é a principal protetora contra bactérias intracelulares, especialmente células T CD4 (JORENS et al., 1995). A penetração no macrófago constitui um mecanismo de escape do patógeno. Uma vez no interior dos macrófagos, as bactérias intracelulares estimulam tanto as células TCD4+ através da expressão de antígenos associados ao complexo de histocompatibilidade maior (MHC) de classe II, como também células TCD8+ através da expressão de antígenos associados a moléculas do MHC de classe I (JANEWAY, 2001). As células TCD4+ se diferenciam em linfócitos do fenótipo Th1, sob a influência de IL-12 produzida por fagócitos infectados e, em seguida, expressam ligante CD40 e secretam INF- γ , que ativam os macrófagos aumentando a produção de óxido nítrico e enzimas lisossômicas, já as células TCD8+ participam do mecanismo de defesa através da citotoxicidade, destruindo os macrófagos infectados (JORENS et al., 1995; ABBAS et al 2008; JANEWAY, 2001).

3. OBJETIVOS

Objetivo geral

Avaliar a atividade imunomoduladora da lectina de *Canavalia brasiliensis* (ConBr) em modelos de infecção experimental por *Listeria monocytogenes*.

Objetivos específicos

- a) Avaliar a citotoxicidade da lectina em cultura de macrófagos.

- b) Avaliar a depuração bacteriana intracelular em macrófagos tratados com ConBr e infectados por *L. monocytogenes*.
- c) Estabelecer a dosagem de inóculo de uma cepa de *L. monocytogenes* adequado para produzir infecção sistêmica sub-letal em camundongos Swiss.
- d) Investigar a influência da lectina ConBr na depuração de *L. monocytogenes* do fígado e baço dos animais infectados.
- e) Quantificar leucócitos presentes no sangue dos animais experimentais tratados com a lectina ConBr e controle, desafiados com *L. monocytogenes*.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Todos os ensaios que envolveram experimentação animal foram conduzidos de acordo com as normas do Comitê de Ética Experimental Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco, em concordância com procedimentos adotados internacionalmente (Nº da Licença: 056/2016 – UFRPE).

4.1 Obtenção das proteínas de *Canavalia brasilienses*

A lectina extraída das sementes da *C. brasiliensis*, foi gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Márcio Viana Ramos. Todo procedimento de extração foi realizado no Laboratório de Bioquímica Vegetal (Universidade Federal do Ceará - Fortaleza) a lectina foi obtida seguindo a metodologia descrita por Moreira; Cavada (1984) e Oliveira *et. al* (1991)

4.2 O micro-organismo

Foi utilizada uma cepa de *L. monocytogenes* isoladas de casos clínicos, cedidas pela pesquisadora Dra. Nilma Cintra Leal do Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ, Recife –PE. As bactérias foram mantidas a -18 °C em meio de cultura Brain Heart Infusion (BHI) contendo 50% de glicerol.

Para os ensaios, as bactérias foram incubadas *overnight* em caldo (BHI), e as culturas foram ajustadas em espectrofotômetro de leitura de densidade óptica para 0,5 a 630 nm (10^8 cél./mL).

4.3 Os animais

Camundongos Swiss fêmeas foram obtidos do Biotério do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA) da Universidade Federal de Pernambuco. Pesavam entre 28 e 35 gramas e foram mantidos em gaiolas com iluminação controlada, temperatura de 25 °C, com livre acesso à água e ração comercial. Os experimentos foram realizados no Laboratório de Microbiologia e Imunologia da Universidade Federal Rural de Pernambuco.

4.4 Obtenção de macrófagos

Culturas primárias de macrófagos peritoneais foram obtidos de camundongos Swiss sob condições assépticas através da lavagem na cavidade peritoneal, utilizando 5 mL de RPMI suplementado de 100 µg/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina pré-aquecido a 37 °C. Uma alíquota do fluído peritoneal obtido foi corada com azul de trypan (0,4%) na proporção 1:1 e posterior quantificação em câmara de Neubauer, com auxílio de microscópio óptico ajustando a quantidade de células para conter 1×10^6 cél/mL. 0,2mL de células foram semeadas em placas de poliestireno de 96 poços, em triplicata, e incubadas *overnight* em incubadora de CO₂ para aderência dos macrófagos. Para o ensaio de citotoxicidade as células foram expostas a diferentes concentrações de lectinas. Nos testes de viabilidade celular e quantificação de bactérias intracelulares os grupos experimentais receberam o tratamento com a lectina ConBr durante 24 horas nas concentrações de 1µg/mL e 10µg/mL e posterior infecção com *L. monocytogenes* na concentração de 2×10^5 cél/mL por 4 horas, seguido de adição de gentamicina (100µg/mL) por 1 hora.

4.5 Viabilidade de macrófagos

A sobrevivência dos macrófagos no ensaio de citotoxicidade e tratamento com lectina e posterior infecção por *L.monocytogenes* foi mensurada de acordo com protocolo utilizando solução de resazurina. Foi adicionado em cada poço 20 microlitros de resazurina (0,15mg/mL) em PBS estéril, sendo as placas incubadas por 2h/ 37 °C. Após esse tempo, a fluorescência produzida foi analisada em leitora de microplaca (570nm e 600nm). Os resultados foram expressos em porcentagens relativas a viabilidade celular de macrófagos não expostas à proteína (RPMI- grupo controle).

4.6 Quantificação de bactérias intracelulares

Para determinar a quantidade de bactérias viáveis intracelulares foram adicionados aos poços 0,2mL do detergente Triton X-100 (0,5%) para lise dos macrófagos, posteriormente as placas foram armazenadas em geladeira a 10°C por 20 minutos. Os lisados celulares foram submetidos a diluições seriadas e 15 µl de cada diluição foram semeadas em placas de BHI por 24 horas para realização de contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) por poço.

4.7 Desenho experimental

Para análise *in vivo* da influência da lectina ConBr durante a infecção por *Listeria monocytogenes*, inicialmente, os camundongos (n=5) foram submetidos ao inóculo intraperitoneal com 0,2 mL de uma solução contendo 2×10^7 , 2×10^6 ou 2×10^5 UFC/mL. A sobrevivência dos animais foi avaliada por um período de 5 dias. Durante esse tempo foi observado o comportamento dos animais, opacidade dos olhos, eriçamento do pelo, prostração e mortalidade. A seguir, os animais foram submetidos à eutanásia com anestésico inalatório, isoflurano.

Nos experimentos que se seguiram, os animais foram separados em 6 grupos (n=3):

G1. Grupo controle: Salina fosfatada tamponada (PBS)

G2. Grupo controle: ConBr 1 mg/kg

G3. Grupo controle: ConBr 10 mg/kg

G4. Grupo controle: PBS + *L. monocytogenes*

G5. Grupo experimental 1: ConBr 1 mg/kg + *L. monocytogenes*

G6. Grupo experimental 2: ConBr 10 mg/kg + *L. monocytogenes*

Foi administrado, por via endovenosa, 0,2 ml de PBS; ou ConBr na concentração de 1 e 10 mg/kg. Após 1 h, os animais pertencentes aos grupos G4, G5 e G6 foram infectados, via intraperitoneal, com 2×10^5 UFCs de *Listeria monocytogenes*. Os animais foram submetidos aos procedimentos de eutanásia 5 dias após a infecção para coleta de amostras e realização de análises.

4.8 Quantificação bacteriana nos órgãos alvo da infecção

Com a finalidade de determinar a depuração bacteriana, baços e fígados dos animais foram removidos assepticamente e homogeneizados em PBS, pH 7,2. As suspensões destes órgãos foram submetidas a diluições seriadas e uma alíquota de 0,1 ml de cada diluição foi plaqueada em Ágar Müeller Hinton. As placas foram incubadas numa câmara de crescimento durante 24h a 37°C para posterior quantificação de unidades formadoras de colônias (UFC).

4.9 Contagem total e diferencial de leucócitos

Para realização da contagem total de leucócitos, 20 µl de sangue obtido por punção cardíaca foi homogeneizada com 380 µL do reagente de Turk, corante utilizado para o evidenciamento de leucócitos. Uma alíquota desta solução foi submetida a contagem em câmara de Neubauer sob luz de um microscópio óptico. Para a contagem diferencial de leucócitos, foi realizada esfregaços de 20 µl de sangue em lâminas e posterior coloração com eosina e hematoxilina. Deste modo foi possível determinar a contagem de monócitos, granulócitos, basófilos e eosinófilos presentes no sangue dos animais nos grupos controle e experimentais.

4.10 Análise estatística

A análise estatística entre os grupos experimentais e controle foi obtida por análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Bonferroni. Para

análises e elaboração dos gráficos foram realizadas no programa PRISMA versão 5.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O uso de lectinas tem sido uma prática comumente utilizada em diversas pesquisas, a fim de investigar a ação direta dessas moléculas para fins terapêuticos (SOUZA et al., 2013; ARANDA-SOUZA et al., 2014). A lectina extraída da leguminosa *Canavalia brasiliensis* (ConBr), tem sido analisada frente a diversos modelos de infecção tendo algumas de suas atividades biológicas já descritas, como atividade imunomoduladora, cicatrizante (SILVA, 2009), neuroprotetora (RUSSI et al., 2012), ativação *in vivo* de linfócitos T e indução de apoptose celular (BARBOSA et al., 2001) e redução da glicemia sanguínea (MESQUITA et al., 2005).

Apesar de ter demonstrado potencialidade farmacológica, estudos envolvendo os efeitos imunoterapêuticos das lectinas em modelos de infecção ainda são incipientes. Batista (2016) avaliou a atividade imunomodulatória das lectinas ConBr e CFL em ensaios *in vitro* envolvendo macrófagos infectados por *Salmonella* Typhimurium e observou que ambas demonstraram atividade protetora no controle desta infecção. Silva (2014), em análise de possível ação antimicrobiana *in vitro* direta de ConBr sobre *S. Typhimurium*, verificou que, nas condições testadas, ConBr não interfere no crescimento da bactéria, dessa forma, não possuindo atividade bactericida.

Assim, o mecanismo protetor da lectina estudada não parece estar diretamente relacionado a alguma ação direta sobre o microrganismo. Considerando o exposto acima, neste estudo a atividade imunomodulatória de ConBr foi analisada em modelos de infecção experimental *in vitro* e *in vivo* por *L. monocytogenes*.

Nesta pesquisa, camundongos Swiss foram tratados com a lectina ConBr e posteriormente desafiados pela *L. monocytogenes* via intraperitoneal. Naturalmente, a listeriose é oriunda da ingestão de alimentos contaminados por *L. monocytogenes*. Contudo, modelos de infecção provocados por inóculos

orais em camundongos produzem variação na taxa de translocação do lúmen intestinal e influenciam a colonização bacteriana nos órgãos alvo. Deste modo, o inóculo de bactérias por via intraperitoneal garante reprodutibilidade na produção de infecções sistêmicas experimentais, haja vista que todos os animais receberão as mesmas concentrações da bactéria para defrontar o sistema imune.

Devido ao potencial farmacológico associado às lectinas, Valadares (2006) descreve a importância da avaliação da toxicidade dessas moléculas, com o propósito de determinar a propensão de substâncias causarem danos à saúde humana. O presente estudo demonstrou através de testes de análise de viabilidade celular que as concentrações de 1 µg/mL e 10 µg/mL de ConBr produziram redução de 18% e 41% na viabilidade dos macrófagos, respectivamente, quando comparado ao controle sem tratamento (Fig. 2).

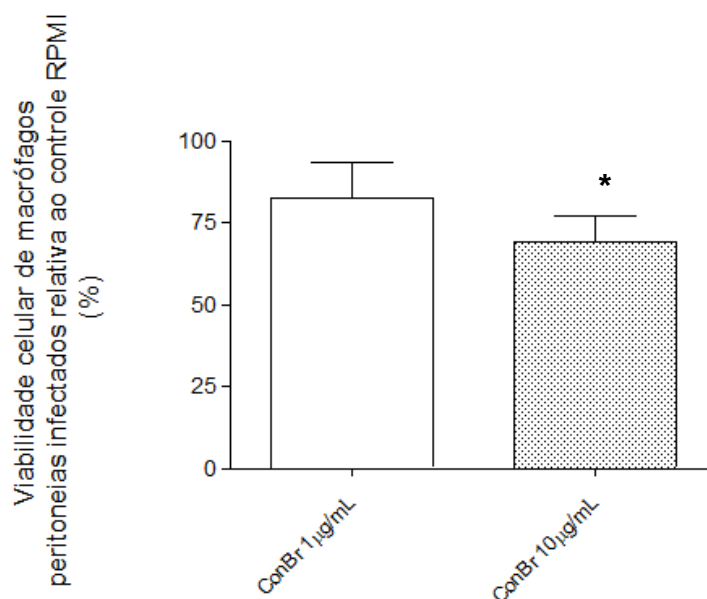


Figura 2 Macrófagos tratados com ConBr nas concentrações de 1µg/mL e 10µg/mL durante 24 horas, tendo como controle o grupo macrófagos não tratados. * representa diferença estatística significativa com $p < 0,05$ em relação ao grupo RPMI.

Apesar disso e considerando dados de estudos anteriores (Batista et al., 2016), os macrófagos peritoneais foram tratados com ConBr, 1 µg/mL e 10 µg/mL e, subsequentemente, infectados por *L. monocytogenes*.

A quantificação de bactérias no ambiente intracelular bem como a capacidade destes macrófagos sobreviverem à infecção após tratamento com ConBr foi investigada. Na quantificação, foi observado que não houve diferença significativa de bactérias intracelulares quando comparados os grupos, com e sem tratamento com ConBr, em ambas as concentrações (Fig. 3).

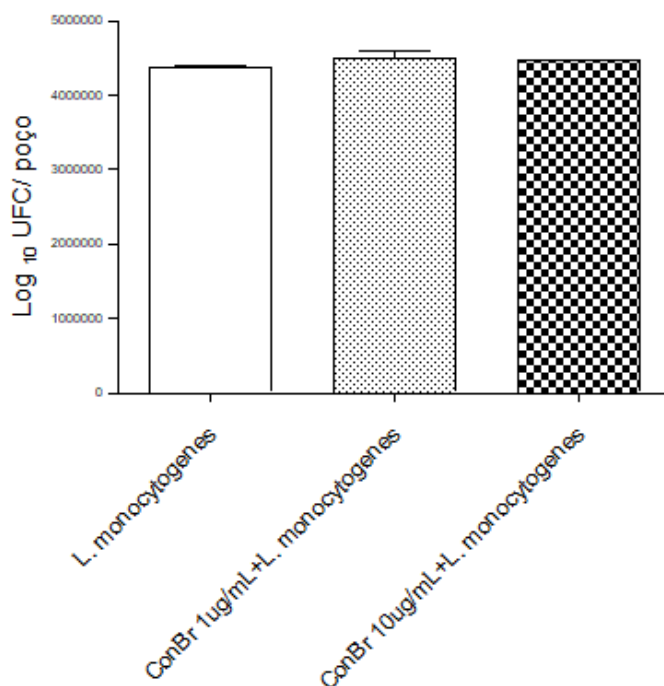


Figura 3 Quantificação de bactérias intracelulares em macrófagos tratados com ConBr nas concentrações de 1µg/mL e 10µg/mL por 24h.

Observou-se uma diminuição na viabilidade dos macrófagos infectados, quando estes receberam tratamento com a ConBr 1 µg/mL e 10 µg/mL, que foi superior àquela observada no grupo controle infectado sem tratamento (Fig. 4). Assim, diferentemente do observado por Batista (2016), quando tratamentos de macrófagos com ConBr protegeram contra infecção por *S. Typhimurium*, não houve ação protetora contra infecção por *L. monocytogenes*.

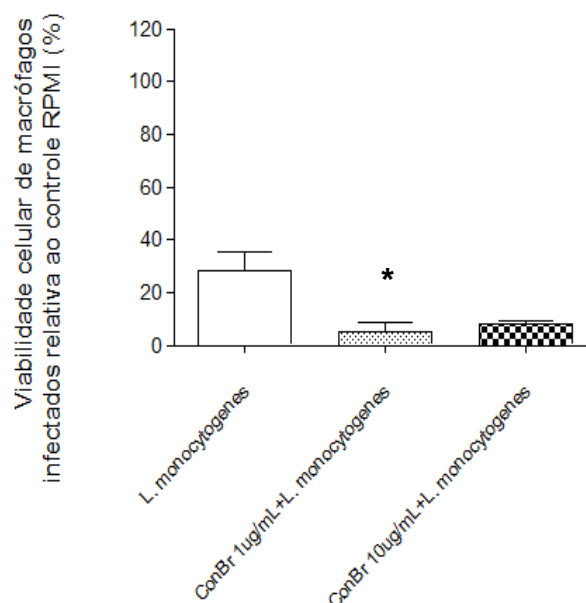


Figura 4 Viabilidade celular de macrófagos tratados com ConBr nas concentrações de 1µg/mL e 10µg/mL por 24h e infectados com *L. monocytogenes* por 4h tendo como controle macrófagos não infectados e não tratados. * corresponde a diferença significativa em relação ao grupo controle.

No ensaio de infecção *in vivo*, foi analisado o efeito da administração endovenosa de ConBr em animais desafiados, via intraperitoneal, com *L. monocytogenes*. Inicialmente foi realizado o teste de sobrevivência a fim de observar e estabelecer a concentração de *L. monocytogenes* para produção de uma infecção sub-letal, que permitisse a coleta de amostras biológicas antes que os animais sucumbissem à infecção. Assim, foi utilizada a concentração de inóculo de 2×10^5 UFC de *L. monocytogenes*. Os animais que receberam 2×10^7 e 2×10^6 UFC não resistiram a mais de 3 dias de infecção.

Cinco dias após a infecção, foi realizada a eutanásia dos animais para quantificação bacteriana no baço e fígado, quando foi observado que ConBr não promoveu aumento na depuração de *L. monocytogenes* nesses órgãos. Ainda, foi observado que os animais não tratados com a lectina foram capazes de depurar completamente a bactéria do baço e fígado, sugerindo que o tratamento com ConBr, nas concentrações de 1 mg/kg e 10 mg/kg, de fato

prejudicou a eliminação de *L. monocytogenes* pelo sistema imunológico (Fig. 5).

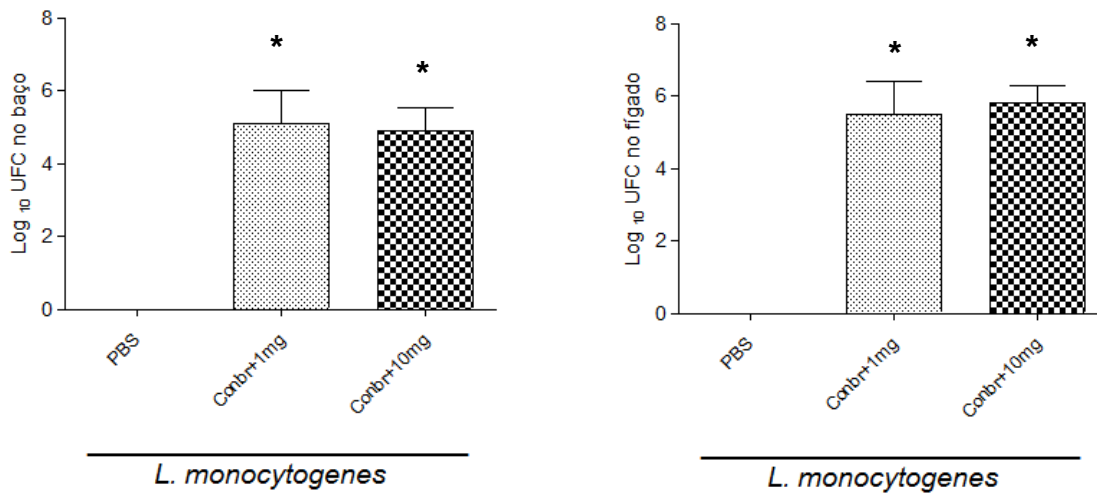


Figura 5 Contagem de bactérias no baço e fígado de animais infectados por *Listeria monocytogenes* e tratados com PBS, Conbr 1mg/kg e Conbr 10mg durante o período de 5 dias. * Corresponde a diferença significativa em relação ao grupo controle.

Na quantificação de leucócitos totais, não houve diferença significativa entre grupos experimentais e controle não infectados. Porém, quando comparados os grupos que foram estimulados com a lectina e desafiados com *L. monocytogenes* com o grupo que não recebeu tratamento com a proteína, houve redução significativa na contagem de leucócitos naqueles tratados com ConBr (Fig. 6).

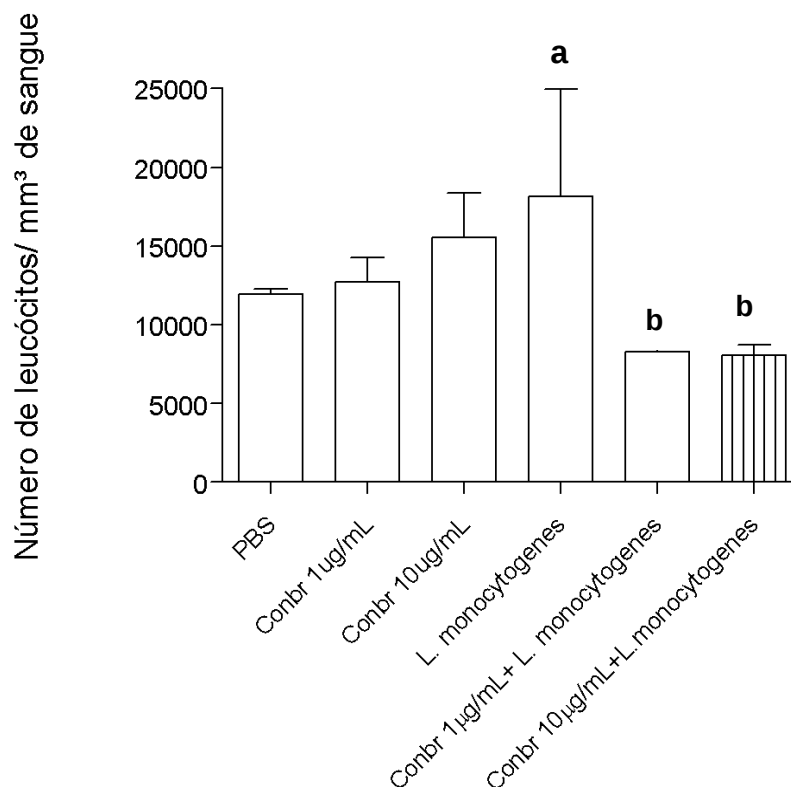


Figura 6 Contagem total de leucócitos no sangue de camundongos pré-tratados com ConBr no modelo de peritonite induzido por *Listeria monocytogenes*. Os resultados foram analisados de acordo com o teste ANOVA seguido pelo pós-teste de Bonferroni. Letras diferentes representam diferença estatística $p < 0,05$.

Na contagem diferencial de leucócitos é observada uma redução significativa na quantidade de linfócitos nos grupos infectados tratados com ConBr (Tabela 1), o que sugere a indução de mediadores antiinflamatórios ou regulação negativa de mediadores inflamatórios. Também redução na contagem de neutrófilos nos tratamentos com 10mg/Kg e macrófagos nos tratamentos com 1 mg/Kg.

Anteriormente, Andrade *et al.* (1999) demonstraram que a administração de ConBr aumenta os níveis de óxido nítrico e este pode induzir uma diminuição da proliferação linfocitária, *in vivo*, nos nódulos linfáticos. Imunologicamente, os linfócitos migram para os órgãos linfoides secundários onde haverá o reconhecimento dos antígenos e a ativação celular para proliferação e diferenciação linfocitária.

GRUPOS	Contagem diferencial de leucócitos (10^3 células/mm ³)				
	Neutrófilo	Linfócito	Monócito	Eosinófilo	Basófilo
<i>L. monocytogenes</i>	3,37 ± 0,18	4,14 ± 0,04	2,97 ± 0,12	2,45 ± 0,17	2,45 ± 0,17
ConBr1 mg + <i>L. monocytogenes</i>	3,24 ± 0,06	3,76* ± 0,01	2,40* ± 0,19	2,55 ± 0,05	1,91 ± 0,00
ConBr10 mg + <i>L. monocytogenes</i>	3,16* ± 0,02	3,73* ± 0,04	2,66 ± 0,24	2,67 ± 0,42	0,63 ± 1,10

Tabela 1. Contagem diferencial de leucócitos no sangue de animais controle (grupo PBS + *L.monocytogenes*) e animais experimentais tratados com ConBr1 mg/kg e ConBr10 mg/kg e infectados com *L.monocytogenes* . Os resultados são expressos como média ± EPM e a comparação dos dados foi por análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Bonferroni. O intervalo de confiança foi determinado com $p < 0,05$. * corresponde a diferença significativa em relação ao grupo controle

Segundo Harty (1996) a resolução de uma infecção por *L. monocytogenes* requer a participação dos mecanismos de imunidade celular inata e adquirida, envolvendo neutrófilos, macrófagos, células NK, linfócitos T e a produção de um arsenal de citocinas; qualquer dano associado a um desses mecanismos dificulta a eliminação da bactéria do organismo do hospedeiro.

Outro fator que pode estabelecer atividades diferentes associadas às lectinas é a via de administração. Dependendo da via podem ser absorvidas de formas diferentes, exercendo atividades pró- ou anti-inflamatórias, ativando ou inibindo a migração de neutrófilos (ALENCAR *et al.*, 1999; ALENCAR *et al.*, 2003; ALENCAR *et al.*, 2004; ALENCAR *et al.*, 2005a; ALENCAR *et al.*, 2005b; ASSREUY *et al.*, 2009).

6. CONCLUSÃO

Apesar de todas as atividades biológicas benéficas já descritas na literatura a respeito da lectina de *Canavalia brasiliensis*, no modelo

experimental utilizado neste estudo foi demonstrado que ConBr induziu propriedades anti-inflamatórias, não colaborando para a eliminação de *L. monocytogenes*, tanto nos ensaios realizados *in vitro* como *in vivo*. Entretanto, o estudo demonstrou a potencialidade da aplicação de ConBr no controle de processos inflamatórios derivados de infecções bacterianas sistêmicas que podem provocar sepse e choque séptico.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A.K.; LICHTMANN, A.; PILLAI, S. **Imunologia celular e molecular**. 6. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, p. 341-345. 2008.

ALENCAR, N.M.N.; TEIXEIRA, E.H.; ASSREUY, A.M.; CAVADA, B.S.; FLORES, C.A.; RIBEIRO, R.A. Leguminous lectins as tools for studying the role of sugar residues in leukocyte recruitment. **Mediators Inflamm.**, v. 8, p. 107–113. 1999.

ALENCAR, N.M.N.; ASSREUY, A.M.; ALENCAR, V.B.; MELO, S.C.; RAMOS, M.V.; CAVADA, B.S.; CUNHA, F.Q.; RIBEIRO, R.A. The galactose-binding lectin from *Vatairea macrocarpa* seeds induces *in vivo* neutrophil migration by indirect mechanism. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, v. 35, p. 1674–1681. 2003.

ALENCAR, N. M. N.; ASSREUY, A.M.; CRIDDLE, D.N.; SOUZA, E.P.; SOARES, P.M.; HAVT, A.; ARAGÃO, K.S.; BEZERRA, D.P.; RIBEIRO, R.A.; CAVADA, B.S. *Vatairea macrocarpa* lectin induces paw edema with leukocyte infiltration. *Protein Pept. Lett.*, v. 11, n. 2, p. 195–200. 2004.

ALENCAR, V.B.M.; ASSREUY, A.M.; ALENCAR, N.M.; MEIRELES, A.V.; MOTA, M.R.; ARAGÃO, K.S.; CAJAZEIRAS, J.B.; NAGANO, C.S.; BRITO, G.A.; SILVA, L.I.; PINTO, V.P.; SAMPAIO, A.H.; DEBRAY, H.; CAVADA, B.S.; RIBEIRO, R.A. Lectin of *Pisum arvense* seeds induces *in vivo* and *in vitro* neutrophil migration. **J. Pharm. Pharmacol.**, v. 57, n. 3, p. 375–381. 2005a.

ALENCAR, V.B.M.; ALENCAR, N.M.; ASSREUY, A.M.; MOTA, M.L.; BRITO, G.A.; ARAGÃO, K.S.; BITTENCOURT, F.S.; PINTO, V.P.; DEBRAY, H.; RIBEIRO, R.A.; CAVADA, B.S. Pro-inflammatory effect of *Arum maculatum* lectin and role of resident cells. **Int. J. Biochem. Cell Biol.**, v. 37, p. 1805–1814. 2005b.

ALENCAR, N.M.N.; OLIVEIRA, R.S.; FIGUEIREDO, J.G.; CAVALCANTE, I.J.; MATOS, M.P.; CUNHA, F.Q.; NUNES, J.V.; BOMFIM, L.R.; RAMOS, M.V. An

anti-inflammatory lectin from *Luetzelburgia auriculata* seeds inhibits adhesion and rolling of leukocytes and modulates histamine and PGE2 action in acute inflammation models. **Inflamm Res.** v.59, n.4, p.245-54. 2010.

ALVES-FILHO, C.J.; BENJAMIM, C.; TAVARES-MURTA, B.M.; CUNHA, F.Q. Failure of neutrophil migration toward infectious focus in severe sepsis: a critical event for the outcome of this syndrome. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 100(Suppl. I), p.223-226. 2005.

ALVES-FILHO, C.J.; FREITAS, A.; SPILLER, F.; SOUTO, F.O.; CUNHA, F.Q. The role of neutrophils in severe sepsis. **SHOCK**, v. 30 (Suppl 1), p. 3-9. 2008.

ANDRADE, J.L.; ARRUDA, S.; BARBOSA, T.; PAIM, L.; RAMOS, M.V.; CAVADA, B.S.; BARRAL-NETTO, M. Lectin-Induced Nitric Oxide Production. **Cell Immunol.**, v.194, p.98–102. 1999.

ARANDA-SOUZA, M.A.; ROSSATO, F.A.; COSTA, R.A.; FIGUEIRA, T.R.; CASTILHO, R.F.; GUARNIERE, M.C.; NUNES, E.S.; COELHO, L.C.; CORREIA, M.T.; VERCESI, A.E. A lectin from *Bothrops leucurus* snake venom raises cytosolic calcium levels and promotes B16-F10 melanoma necrotic cell death via mitochondrial permeability transition. **Toxicon**. v. 82, p. 97-103. 2014.

ARLETE A. M. COELHO CASTELO , ANA P. F. TROMBONE , CAROLINA D. ROCHA , JULIO C. C. LORENZINI. Immune response to infectious diseases. **Medicina** (Ribeirão Preto) 2009.

ASSREUY, A.M.S.; FONTENELE, S.R.; PIRES, A.F.; FERNANDES, D.C.; RODRIGUES, N.V.; BEZERRA, E.H.; MOURA, T.R. ; NASCIMENTO, K.S.; CAVADA, B.S. Vasodilator effects of *Diocleinae* lectins from the *Canavalia* genus. **Naunyn-Schmied Arch. Pharmacol.**, v. 380, p. 509–521. 2009.

BARBOSA, T.; ARRUDA, S.; CAVADA, B.S.; 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.; VON SOHSTEN, R.L.; TEIXEIRA, M.; SANTOS, W.L.; POMPEU, M.L.; MOREIRA, R.A.; OLIVEIRA, J.T.; CAVADA, B.S.; FALCOFF, E.; BARRAL, A. *In vivo* protective effect of the lectin from *Canavalia brasiliensis* on BALB/c mice infected by *Leishmania amazonensis*. **Acta trop.**, v. 60, p.237-250. 1996.

BATISTA J. E., RALPH M.T, VAZ. R. V.,SOUZA P.,NASCIMENTO D.,LIMA-FILHO J. V.. 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** 2017 Feb 15;25:52-60. doi: 10.1016/j.phymed.2016.12.005. Epub 2016 Dec 13.

BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Doenças infecciosas e parasitárias: Guia de Bolso. 8ª ed. **rev. Brasília:** Ministério da Saúde, 2010.

BUCHANAN, RL, MH GOLDEN. Differentiation of the effects of pH and lactic or acetic acid concentration on the kinetics of *Listeria monocytogenes* inactivation. **J. Food Prot.** 56: 474-478, 484. 1993.

BUCHANAN, R. L.; M. H., GOLDEN. Interaction of citric acid concentration and pH on the kinetics of *Listeria monocytogenes* inactivation. **J. Food Protect.**, v. 57, p. 567-570, 1994.

CENTRO PARA CONTROLE DE DOENÇAS: Resumo das doenças de notificação obrigatória, Estados Unidos. MMWR, **Morb Mortal Wkly Rep**, 2000.

CENTRO DE VIGILANCIA EPIDEMIOLÓGICA DO ESTADO DE SÃO PAULO, Manual de doenças transmitidas por alimentos e água, *Listeria monocytogenes*. Disponível em .Acesso em 18 agosto. 2016.

CRUVINEL, W. M.; JÚNIOR, D. M.; ARAUJO, J. A. P.; CATELAN, T. T. T.; Immune system: Part I. Fundamentals of innate immunity with emphasis on molecular and cellular mechanisms of inflammatory response. **Revista brasileira de reumatologia** 50 (4), 434-447, 2010.

CRUZ, C. D.; MARTINEZ M. B.; DESTRO, M. T.; *Listeria monocytogenes*: um agente infeccioso ainda pouco conhecido no Brasil. **Alim. Nutr.**, Araraquara v.19, n.2, p. 195-206, 2008.

Delves PJ, Roitt D. The Immune System - First of two parts. **N Engl J Med** 2000; 343:37-50

DIAZ, P. H.; GONZALEZ, O. M.; VELEZ, Y. R. P.; BAEZ, F. A. G. Aplicatons de las lectinas. **Revista Cubana de hematologia inmunologia y Hemoterapia**, v. 15, n. 2, p. 91-95, 1999.

DINARELLO, C.A. Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. Annu. **Rev. Immunol.** v. 27, p. 519–550. 2009.

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

FARBER, J.M.; PETERKIN, P.I. *Listeria monocytogenes*. In Lund, B.; Baird-Parker, T.; Gould, G., The Microbiological Safety and Quality of Food. **An Aspen Publication. Volume II** (cap. 44), p. 1178-1216, 2000.

FAUCI, A.S. Infectious Diseases: Considerations for the 21st Century. **Clin Infect Dis**. v. 32, n. 5, p. 675-685. 2001.

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

GABOR, F.; KLAUSEGGER, U.; WIRTH, M. The interaction between wheat germ agglutinin and other plant lectins with prostate cancer cells Du-145. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 221, p. 35-47, 2001.

GOMES, J.C.; FERREIRA, R.R.; CAVADA, B.S.; MOREIRA, R.A.; OLIVEIRA, J.T. Histamine release induced by glucose (mannose)-specific lectins isolated from Brazilian beans. Comparison with concanavalin A. **Agents Actions**, v. 41, p. 132-135. 1994.

GLOMSKI, I.J.; GEDDE, M.M.; TSANG, A.W.; SWANSON, J.A.; PORTNOY, D.A. The *Listeria monocytogenes* hemolysin has an acidic pH optimum to compartmentalize activity and prevent damage to infected host cells. **Journal of cell biology**, 156:1029-1038, 2002.

GOLDSTEIN, I.I., R.E. HUGHES, M. MONSIGNY, T. OZAWA & N. SHARON. 1980. What should be called a lectin? **Nature** 285:66.

HOF, F.; NICTERLEIN, T.; KRETSCHMAR, M. Management of listeriosis. **Clinical Microbiology Reviews.**, 10:345-357, 1997.

JACKSON B. R.; TARR, C.; STRAIN, E.; JACKSON K. A.; CONRAD A.; CARLETON, H. Implementation of nationwide whole-genome sequencing to enhance listeriosis outbreak detection and investigation. **PubMed**. 2016.

JANEWAY C.A. How the immune system protects the host from infection. **Microbes and Infection.**, 3:1167-1171, 2001.

JOBIM M.; JOBIM L. F.; Natural killer cells and immune surveillance. **Jornal pediátrico** (Rio de Janeiro). 84 (4 suppl): 558-67, 2008

JONG, H.K.; VAN DER POLL, T.; WIERSINGA, W.J. The systemic pro-inflammatory response in sepsis. **J. Innate Immun.** v. 2, p. 422-430. 2010.

- JOSENS, P. G.; MATTHYS, K. E.; BULT, H. Modulation of nitric oxide synthase activity in macrophages. **Mediators of Inflammation**. V. 4, n. 2, p. 75–89, 1995
- KATHARIOU, S. *Listeria monocytogenes* virulence and pathogenicity, a food safety perspective. **Journal of Food Protection**, v.65, n.11, p.1811-1829, 2002.
- KAWAI, T.; AKIRA, S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol.* v. 11, p. 373–384. 2010.
- KOCKS, C. GOUIN, E.; TABOURET, M.; BERCHE, B.; OHAYON, H.; COSSART, P. *L. monocytogenes* induced actin assembly requires the *actA* gene product, a surface protein. **Cell**, 68:521-531, 1992.
- KONEMAN, E. C.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. M.; SCHRECKENBERGER, P. C.; WINN, W. C. J. **Diagnóstico Microbiológico**, 5ª edição, p.661-663.
- LECUIT, M. Human listeriosis and animal models. **Microbes and Infection**, 9: 1216-1225, 2007.
- LIMA, H. C. Fatos de mitos sobre imunomoduladores. **Anais Brasileiros de dermatologia**, v.82, n.3, maio- junho 2007.
- MEDZHITOV R, PRESTON-HURLBURT P, JANEWAY CA JR. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. **Nature** 1997; 388:394-7.
- MENGAUD, J. et al. E-cadherin is the receptor for internalin, a surface protein required for entry of *L. monocytogenes* into epithelial cells. **Cell**, v.84, n.6, p.923-932, Mar. 1996
- MESQUITA, R. O.; ARAGÃO, K. S.; BITENCOURT, F. S.; SILVESTRE, P. P.; VASCONCELOS, M. P.; NASCIMENTO, K. S.; BENEVIDES, R. G.; VALE, M. R.; CAVADA, B. S.; ALENCAR, N. M. N. Lectina de sementes de *Canavalia brasiliensis* (Conbr) reduz a glicemia em ratos diabéticos. **Anais da 57ª Reunião Anual da SBPC**- Fortaleza – CE, 2005.
- MOREIRA, R.A.; CAVADA, B.S. Lectin from *Canavalia brasiliensis* (Mart.). Isolation, characterization and behavior during germination. **Biologia Plantarum**, v. 26, nº 2, p. 113-120, 1984.
- MOREIRA, R. A. Et al. Plant lectins: chemical and biological aspects. **In: Congress on proteins of the Brazilian**, São Paulo, p. 73-96 1990.
- MOREIRA, R. A.; CAVADA B. S.; DE OLIVEIRA, J. T. A.; AINOUS, I. L. Lectinas de plantas. In: Proceedings of the First Brazilian Congress on Proteins. São Paulo. **Editores da Unicamp**, 1991.

MURRAY, Patrick R. **Microbiologia Médica**. 3º edição, editora Guanabara Koogan, p.181-183, São Paulo, 2000.

NIGHTINGALE, K. K., SCHUKKEN, Y. H., NIGHTINGALE, C. R., FORTES, E. D., HO, A. J., HER, Z., GROHN, Y. T., et al. (2004). Ecology and transmission of *Listeria monocytogenes* infecting ruminants and in the farm environment. **Appl Environ Microbiol**, 70, 4458 - 4467. Acedido em Nov. 17, disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC492327/>

NIGHTINGALE, K. K., FORTES, E. D., HO, A. J., SCHUKKEN, Y. H., GROHN, Y. T. & WIEDMANN, M. (2005). Evaluation of farm management practices as risk factors for clinical listeriosis and fecal shedding of *Listeria monocytogenes* in ruminants. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, 227(11), 1808-1814., disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16350271>

OPAL, S. M.; ESMON, C.T. Bench-to-beside review: functional relationships between coagulation and the innate immune response and their respective roles in the pathogens of sepsis. **Critical Care**, 7:23-38, 2003.

PENG, H.; LV, H.; WNAG, Y.; LIU, Y. H.; LI, C. Y.; MENG, L. ; CHEN, F.; BAO, J. K. . *Clematis montana* lectin, anovel mannose-binding lectin from traditional Chinese medicine with antiviral and apoptosis-inducing activities. **Peptides**, v. 30, n. 19, p. 1805-1815, oct. 2009 .

PINTADO, C.M.B.S. Efeito de bioconservantes no crescimento e sobrevivência de *Listeria monocytogenes* em queijo de ovelha. Tese de Doutorado em Engenharia Agro-Industrial. **Instituto Superior de Agronomia. Universidade Técnica de Lisboa**, 2009.

RAMASWAMY, V.; CRESENCE, V.M.; REJITHA, J.S.; LEKSHMI, M.U.; DHARSANA, K.S.; PRASAD, S.P.; VIJILA, H.M. *Listeria* – review of epidemiology and pathogenesis. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, 40: 4-13, 2007.

ROITT, I.M. *Imunologia*. São Paulo: **Manole**, 1999. 424p.

RUBY, T.; MCLAUGHLIN, L.; GOPINATH, S.; MONACK, D. *Salmonella's* long-term relationship with its host. **FEMS Microbiol Rev**. v. 36, p. 600–615. 2012.

RUSSI, M. A.;VANDRESEN-FILHO, S.; RIEGER, D. K.; COSTA, A. P.; LOPES, M. W.; CUNHA, R. M.; TEIXEIRA, E. H.; NASCIMENTO, K. S.; CAVADA, B. S.; TASCA, C. I.; LEAL, R. B. ConBr, a lectin from *Canavalia brassiliensis* seeds, protects against quinolinic acid-induced seizures in mice. **Neurochemical Research**, v.37, n.2, p. 288-297, 2002.

RYSER, E. T.; MARTH, E. H.. *Listeria, Listeriosis, and Food Safety*, Third Edition 3rd ed. 2007.

SAUER, J. Revision of *Canavalia*. *Brittonia*, v.16, n.2, p.106-181, 1964.

SEELIGER, H.P.R.; JONES, D. *Listeria*. In: Sneath, P.; Mair, N.; Sharpe, M.; Holt, J.. **Bergeys's Manual of Systematic Bacteriology**, Williams and Wilkins, Baltimore, 1235–1245, 1987.

SILVA, F.O.; ARAÚJO, R. V.S.; SCHIRATO, G.V.; TEIXEIRA, E.H; CAVADA, B.S.; JUNIOR, M.R.M.; LIMA-FILHO J.L.; CARNEIRO LEÃO, A. M.A.; PORTO, A. L. F. Perfil de proteases de lesões cutâneas experimentais em camundongos tratadas com a lectina isolada das sementes de *Canavalia brasiliensis*. **Ciência Rural**, v.39, n.6, p. 1808-1814, set. 2009.

SHARON, N.; LIS, H. History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. **Glycobiology**, v. 14, n. 11, p. 53-62, 2004.

SKOGBERG, K.; SYRJANEN J.; JAHKOLA, M.; Apresentação clínica e resultado da listeriose em pacientes com e sem terapia imunossupressora. **Clin Infect**. 1992

SOUZA, M.A.; CARVALHO, F.C.; RUAS, L.P.; RICCI-AZEVEDO, R.; ROQUE-BARREIRA, M.C. The immunomodulatory effect of plant lectins: a review with emphasis on ArtinM properties. **Glycoconj J**. v. 30, n. 7, p. 641-657. 2013.

TEIXEIRA, C.R.; CAVASSANI, K.A.; GOMES, R.B.; TEIXEIRA, M.J.; ROQUE-BARREIRA, M.C.; CAVADA, B.S.; DA SILVA, J.S.; BARRAL, A.; BARRAL-NETTO, M. Potential of KM+ lectin in immunization against *Leishmania amazonensis* infection. **Vaccine**, v. 24, p. 3001–3008. 2006.

VALADARES, M.C. Avaliação de toxicidade aguda: estratégias após a “era do teste DL50” **Rev. Elet. Farmácia**. v. 3, n. 2, p. 93-98. 2006.

VAN DAMME, E. J. M.; LANNON, .N.; PEUMANS W. J. Plants Lectins. *Advances in Botanical Research*, p. 107-209, 2008.

VAZQUEZ-BOLAND, J. A. et al. Preliminary evidence that different domains are involved in cytolytic activity and receptor (cholesterol) binding in listeriolysin O, the *Listeria monocytogenes* thiol-activated toxin. **FEMS Microbiol. Lett.**, v.53, n.1-2, p.95-99, 1989.

VAZQUEZ-BOLAND, J. A. et al. Pathogenicity islands and virulence evolution in *Listeria*. *Microbes Infect.*, v.3, n.7, p.571-584, 2001.

VAZQUEZ-BOLAND, J. A.; et al. *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. **Clin. Microbiol. Rev.**, v.14, n.3, p.584-640, 2001.

