



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
CURSO DE BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

ROSEANE THAYS DOS SANTOS ROCHA

**AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DA LECTINA DE *Cratylia argentea* (CFL) CONTRA
A INFECÇÃO EXPERIMENTAL POR *Listeria monocytogenes***

Recife

2024

ROSEANE THAYS DOS SANTOS ROCHA

**AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DA LECTINA DE *Cratylia argentea* (CFL) CONTRA
A INFECÇÃO EXPERIMENTAL POR *Listeria monocytogenes***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Bacharelado em Ciências Biológicas da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador: José Vitor Moreira Lima Filho

Coorientador: Lucas Nunes Santana

Recife

2024

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal Rural de Pernambuco
Sistema Integrado de Bibliotecas
Gerada automaticamente, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

R672a

Rocha, Roseane Thays dos Santos
AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DA LECTINA DE *Cratylia argentea* (CFL) CONTRA A INFECÇÃO
EXPERIMENTAL POR *Listeria monocytogenes* / Roseane Thays dos Santos Rocha. - 2024.
42 f. : il.

Orientador: Jose Vitor Moreira Lima Filho.
Coorientador: Lucas Nunes Santana.
Inclui referências.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, , Recife,
2024.

1. Listeriose. 2. Fitoterapia. 3. Imunomodulador. 4. Macrófagos. 5. Citocinas. I. Filho, Jose Vitor Moreira
Lima, orient. II. Santana, Lucas Nunes, coorient. III. Título

CDD

ROSEANE THAYS DOS SANTOS ROCHA

**AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DA LECTINA DE *Cratylia argentea* (CFL) CONTRA
A INFECÇÃO EXPERIMENTAL POR *Listeria monocytogenes***

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Bacharelado em
Ciência Biológicas da Universidade
Federal Rural de Pernambuco, como
requisito parcial para obtenção do título de
Bacharel em Ciências Biológicas.

Aprovado em: 03/10/2024

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. José Vitor Moreira Lima Filho (Orientador)
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Profa. Dra. Yone Vila Nova Cavalcanti (Examinador Interno)
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Profa. Dra. Betty Mancebo Dorvigny (Examinador Externo)
Universidade Federal de Pernambuco

AGRADECIMENTOS

Ao fim deste ciclo, com muita emoção dedico estas palavras de amor e agradecimento para todos que me acompanharam e contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização de todos os passos que culminaram neste trabalho.

Primeiramente, agradeço a Deus por estar comigo em todo o momento desde o início desta minha fase até a sua conclusão. A fé me fez seguir em frente mesmo em caminhos escuros e incertos. Aqui eu encontrei minhas certezas.

À mim, por ter vivido todo o processo acadêmico apesar de todos os viés da vida. E por não desistir de mim mesma.

Aos meus pais, que foram excepcionais para a minha construção como pessoa e no cumprimento da minha graduação em meio a tantas batalhas. À minha mãe, em especial, minha melhor amiga, que me deu forças e não me deixou desistir dos meus sonhos acadêmicos.

À Valderez, minha mãe na ciência, que me incentivou a escolher Ciências Biológicas, e viver a universidade em todas as suas nuances.

À Juliana, minha irmã do coração, que compartilha comigo as experiências da vida, crescendo juntas e apoiando uma à outra.

À Universidade Federal Rural de Pernambuco, pela oportunidade de estudar, por proporcionar as melhores condições para a vivência acadêmica, e por sempre priorizar o bem-estar dos seus discentes.

Ao meu orientador, professor José Vitor, que sempre se mostrou disponível para a construção do meu conhecimento, e me apoiou em todas as minhas escolhas. Ao meu coorientador Lucas, por me acolher, e pelo compartilhamento da correria e do conhecimento no laboratório. Aos membros do Laboratório de Microbiologia e Imunologia: Joyce, Kássia, Islana, Esther, Camila, Viviane, Víctor e Isabela pelo apoio mútuo nos trabalhos de todos. Sem vocês, este trabalho não seria concluído.

Aos professores Márcio Ramos, da Universidade Federal do Ceará, e Rinaldo Mota, da UFRPE, à pesquisadora Nilma Leal da Fundação Oswaldo Cruz/Universidade Federal de Pernambuco, e aos componentes do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami, da UFPE, por proporcionarem as condições necessárias para a realização deste trabalho.

Aos meus amigos, André, Camila, Maria Clara Eugênio, Maria Clara Almeida, Beatriz, Alanis e Vitória, pelos bons momentos juntos e pelo companheirismo na jornada acadêmica. À Franciele, por iluminar minha vida até em meus dias mais sombrios e por estar do meu lado em todos os momentos. Vocês foram, sem dúvidas, uma das minhas maiores conquistas na universidade.

A todos vocês, serei eternamente grata.

RESUMO

A *Listeria monocytogenes* é o agente etiológico causador da listeriose, uma infecção de origem alimentar que acomete diversas espécies animais, inclusive seres humanos. Suas características patogênicas a tornaram uma preocupação significativa para a indústria alimentícia, sobrevivendo e proliferando em condições ambientais adversas. No âmbito de alternativas contra a ação da *L. monocytogenes*, a lectina de *Cratylia argentea* (CFL), tem demonstrado capacidade de auxiliar o sistema imunológico do hospedeiro no processo de identificação do organismo invasor. Neste sentido, investigamos, *in vitro* e *in vivo*, a influência da lectina CFL contra a infecção causada por *L. monocytogenes* em camundongos Swiss. Para o teste *in vitro*, os camundongos foram infectados com as concentrações 1×10^5 e 2×10^5 UFC/mL, inoculando 200 μ L em cada grupo via intraperitoneal. Macrófagos peritoneais foram recolhidos, fixados em estufa com 5% de CO₂ e, 24h após foram tratadas com 9 doses de CFL: variadas entre 100 μ g/mL e 0,39 μ g/mL; enquanto os grupos controles receberam apenas RPMI e gentamicina 10 μ g/mL. Após 24h de tratamento, foram feitas as análises de viabilidade celular e quantificação de bactérias intracelulares. Para o teste *in vivo*, avaliamos inicialmente a sobrevivência dos animais durante cinco dias após a administração do inóculo via intragástrica, utilizando concentrações que variaram entre 2×10^3 e 2×10^9 UFC/mL, com um volume de 200 μ L. A seguir, baço, fígado e sangue foram coletados para quantificação bacteriana. A partir disso, realizamos um teste para avaliar a ação da lectina associada ao antibiótico. Os animais foram inoculados com a concentração de 2×10^9 UFC/mL, via intragástrica, e o tratamento iniciado 24h depois. As análises foram feitas após 24h e 96h após o tratamento, com coleta do sangue, baço, fígado e linfonodos. Os resultados do primeiro teste mostraram que a dose 100 μ g/ml manteve um percentual de viabilidade celular alto quando comparada com o grupo tratado com gentamicina, e houve uma diferença significativa nas dosagens 100 e 50 μ g/mL de CLF em relação ao grupo RPMI, que foi infectado e não tratado. Para o segundo teste, o inóculo com a concentração 2×10^9 UFC/mL apresentou os dados clínicos esperados de uma infecção. Após as 96h de tratamento, a partir das análises, o baço e linfonodo tratados com CFL isolada e em conjuntura com o antibiótico, apresentaram diferenças significativas na diminuição da carga bacteriana quando comparadas ao grupo tratado com solução salina. Também, a lectina

diminuiu a concentração de leucócitos totais no sangue, indicando seu potencial anti-inflamatório. Ainda, o grupo tratado com CFL apresentou maior produção de transcritos de mRNA para as citocinas pró e anti-inflamatórias. Como conclusão, foi possível observar que a CFL pode modular a atividade bactericida, aumentando também a viabilidade de macrófagos após a infecção por *L. monocytogenes*. Ademais, a sua junção com antibacterianos mostrou potencial ação anti-inflamatória a longo prazo, podendo evitar o choque séptico.

Palavras-chave: Listeriose; Fitoterapia; Imunomodulador; Macrófagos; Citocinas.

ABSTRACT

Listeria monocytogenes is the etiological agent responsible for listeriosis, a foodborne infection that affects various animal species, including humans. Its pathogenic characteristics have made it a significant concern for the food industry, as it survives and proliferates in adverse environmental conditions. Among the alternatives to combat *L. monocytogenes*, the lectin from *Cratylia argentea* (CFL) has demonstrated the ability to assist the host's immune system in identifying the invading organism. In this context, we investigated, both in vitro and in vivo, the influence of CFL lectin against infection caused by *L. monocytogenes* in Swiss mice. For the in vitro test, the mice were infected with concentrations of 1×10^5 and 2×10^5 CFU/mL, inoculating 200 μ L into each mouse's peritoneal cavity. Peritoneal macrophages were collected, incubated in a 5% CO₂ environment, and after 24 hours, they were treated with 9 different doses of CFL, ranging from 100 μ g/mL to 0.39 μ g/mL, while the control groups received only RPMI and 10 μ g/mL gentamicin. After 24 hours of treatment, cell viability analyses and quantification of intracellular bacteria were performed. For the in vivo test, we initially evaluated the survival of the animals over five days after the inoculum was administered via intragastric injection, using concentrations ranging from 2×10^3 to 2×10^9 CFU/mL, with a volume of 200 μ L. Following this, the spleen, liver, and blood were collected for bacterial quantification. We then performed a test to evaluate the effect of lectin combined with the antibiotic. The animals were inoculated with a concentration of 2×10^9 CFU/mL via intragastric injection, and the treatment began 24 hours later. Analyses were conducted at 24 and 96 hours post-treatment, with the collection of blood, spleen, liver, and lymph nodes. The results of the first test showed that the 100 μ g/mL dose maintained a high percentage of cell viability compared to the group treated with gentamicin, and there was a significant difference in the 100 and 50 μ g/mL doses of CFL compared to the RPMI group, which was infected but not treated. For the second test, the inoculum with a concentration of 2×10^9 CFU/mL presented the expected clinical signs of an infection. After 96 hours of treatment, analyses showed that the spleen and lymph nodes treated with CFL alone and in combination with the antibiotic showed significant differences in the reduction of bacterial load compared to the group treated with saline solution. Additionally, the lectin reduced the total white blood cell count in the blood, indicating its anti-inflammatory potential. Furthermore, the group treated

with CFL showed higher mRNA transcript production for both pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines. In conclusion, it was observed that CFL can modulate bactericidal activity, also increasing macrophage viability after infection by *L. monocytogenes*. Moreover, its combination with antibacterial agents demonstrated potential long-term anti-inflammatory action, possibly preventing septic shock.

Keywords: Listeriosis; Phytotherapy; Immunomodulator; Macrophages; Cytokines.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. <i>L. monocytogenes</i> vista em microscópio óptico com aumento de 1000x..	16
Figura 2. <i>C. argentea</i> fotografada em seu hábitat natural.....	20
Figura 3. Quantificação bacteriana intracelular (A) e viabilidade (B) de macrófagos peritoneais infectados com <i>L. monocytogenes</i> com o inóculo de 1×10^5 UFC/ml.....	29
Figura 4. Quantificação bacteriana intracelular (A) e viabilidade (B) de macrófagos peritoneais infectados com <i>L. monocytogenes</i> com o inóculo de 2×10^5 UFC/ml.....	29
Figura 5. Quantificação bacteriana do sangue (A) e órgãos (B, C e D) de camundongos Swiss infectados por <i>L. monocytogenes</i> após 24h e 96h de tratamento.....	31
Figura 6. Expressão relativa das citocinas IL-1 β , TNF- α , IL-6 e IL-10 em amostras de cDNA de baço de camundongos infectados com <i>L. monocytogenes</i> , normalizados em GAPDH, em 24h e 96h após o tratamento.....	34

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Primers utilizados na amplificação de cDNA por meio de RT-qPCR..... **26**
- Tabela 2.** Contagem total e diferencial de leucócitos no sangue dos animais infectados por *L. monocytogenes* após 24h de tratamento..... **33**
- Tabela 3.** Contagem total e diferencial de leucócitos no sangue dos animais infectados por *L. monocytogenes* após 96h de tratamento..... **33**

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APCs	Células Apresentadoras de Antígenos
cDNA	Ácido Desoxiribonucleico complementar
CFL	Lectina de <i>Cratylia argentea</i>
CO ₂	Dióxido de carbono
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
IFN- γ	Interferon-gama
IgE	Imunoglobulina E
IL-1	Interleucina-1
IL-6	Interleucina-6
IL-10	Interleucina-10
IL-12	Interleucina-12
InA	Internalina A
InB	Internalina B
InC	Internalina C
iNOS	Óxido Nítrico Sintase induzível
LLO	Listeriolisina
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase
MHC I	Complexo Principal de Histocompatibilidade I
mRNA	RNA mensageiro
NK	Natural Killer
NO	Óxido Nítrico
PAMPs	Padrões Moleculares Associados a Patógenos
PBS	Solução Salina Tamponada com Fosfato
PlcA	Fosfolipase A
PlcB	Fosfolipase B
pM \emptyset	Macrófago peritoneal
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RNA	Ácido Ribonucleico
RT-qPCR	Reação em Cadeia da Polimerase com Transcrição Reversa Quantitativa
Th	Células T helper ou auxiliares
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral-alfa

TRL	Receptores Semelhantes a Toll
UFC	Unidades Formadoras de Colônia

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	13
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	15
2.1 <i>Listeria monocytogenes</i> e a listeriose.....	15
2.2 Processo Infeccioso.....	16
2.3 Resposta Imunológica.....	17
2.4 Lectinas vegetais.....	18
2.5 <i>Cratylia argentea</i> e a lectina CFL.....	19
3. OBJETIVOS.....	21
3.1 Geral.....	21
3.2 Específicos.....	21
4. METODOLOGIA.....	22
4.1 Animais.....	22
4.2 Lectina.....	22
4.3 Microrganismo.....	22
4.4 Desenho experimental.....	22
4.4.1 Teste <i>in vitro</i>	22
4.4.2 Teste de inóculo.....	24
4.4.3 Infecção experimental por <i>L. monocytogenes in vivo</i>	24
4.5 Estatísticas.....	27
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	28
6. CONCLUSÃO.....	36
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	37

1. INTRODUÇÃO

Os microrganismos possuem papéis importantes na formação e na perpetuação da vida. Contudo, também podem causar inúmeros tipos de infecções e intoxicações nos indivíduos que entram em contato com eles (Tortora *et. al.*, 2017). As doenças infecciosas estão entre as principais preocupações em escala mundial, sendo apontadas entre as 10 principais causas de mortes globais (Organização Mundial de Saúde, 2024).

A *Listeria monocytogenes* é uma bactéria com morfologia de bastonete, gram-positiva, euritópica, anaeróbica facultativa e agente etiológico da listeriose, uma infecção de origem alimentar que pode causar sintomas como diarreia, vômito e febre. Capaz de contaminar laticínios, a bactéria apresenta-se como uma grande preocupação para a indústria alimentícia por também ser psicotrófica, ou seja, capaz de crescer em temperaturas abaixo de 7°C (Meloni, 2014); além de possuir mecanismos patogênicos que permitem a sua sobrevivência no interior de células fagocíticas (Tortora et al., 2017). Ademais, a infecção por *L. monocytogenes*, pode evoluir para outros agravos como a sepse bacteriana, meningite bacteriana, infecção do feto e até mesmo o aborto, em pacientes imunossuprimidos, idosos e gestantes (Radoshevich e Cossart, 2018).

Diante do cenário de aumento de cepas bacterianas resistentes aos agentes antimicrobianos, preocupação que apresenta-se como uma das principais ameaças globais à saúde pública que a humanidade enfrenta (Organização Mundial de Saúde, 2023), tem-se a necessidade de desenvolvimento de novas formulações antimicrobianas. Desta forma, as lectinas vegetais mostram-se como propriedades biotecnológicas e demonstram potencial anti-infectivo, sendo mediadoras de diferentes processos biológicos (Oliveira, 2018).

As lectinas estão amplamente distribuídas pela natureza, sendo componentes de vários organismos, como vírus, fungos, bactérias, plantas e animais. Elas são consideradas revolucionárias por conter propriedades ligantes a carboidratos que auxiliam na identificação e consequente eliminação do organismo invasor, resultado da modulação da resposta imunológica (Oliveira, 2018; Santana et al., 2022; Romagnani, 2007). A lectina de *Cratylia argentea*, de sinônimo *Cratylia floribunda* (CFL), mostrou anteriormente ação protetora e ação moduladora na atividade

bactericida de macrófagos contra a infecção por *Salmonella enterica* (Silva, 2014; Batista et al., 2017).

O presente estudo investigou se a lectina de *C. argentea* (CFL) influencia na fagocitose e destruição intracelular de *L. monocytogenes* e na resposta imune em camundongos Swiss infectados.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Listeria monocytogenes* e a listeriose

A *Listeria monocytogenes* é uma bactéria com morfologia de bacilo curto, Gram-positiva, ubiqüitária, não formadoras de esporos ou cápsulas, intracelular e anaeróbica facultativa. Possui flagelos peritríquios que garantem certa motilidade para a bactéria, sendo esta típica, em espiral e baseada em actina (Barancelli *et al.*, 2011; Meloni, 2014; Zhang *et al.*, 2017).

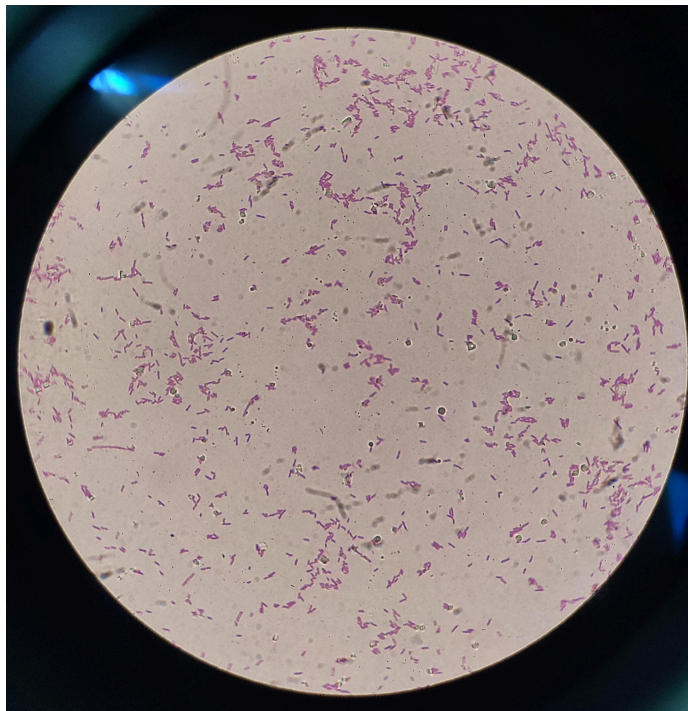
Sendo comum em diferentes habitats, com prevalência nos solos e águas, a *L. monocytogenes* possui uma grande tolerância em relação ao ambiente, podendo sobreviver e crescer em condições adversas (Farber *et al.*, 2020). A temperatura ideal para o seu crescimento varia entre 30 - 37° C (Meloni, 2014). Contudo, é classificada como psicotrófica por ser capaz de sobreviver e crescer em temperaturas até 4,4° C (Carvalho, 2010).

Entre as espécies do gênero *Listeria*, as espécies consideradas patogênicas são a *L. monocytogenes*, *L. ivanovii* e *L. seeligeri*, sendo estas últimas menos comuns, e a *L. ivanovii* mais associada à infecção em ruminantes (Farber *et al.*, 2020; Meloni, 2014). Assim, a *L. monocytogenes* é o agente etiológico da listeriose, uma infecção de origem alimentar que causa sintomas como febre, diarreia e vômito, provocando uma grande preocupação para a indústria alimentícia, por suas características de adaptação ao ambiente, podendo estar presente em hortaliças, laticínios e frios; ainda, pode contaminar os equipamentos que processam os produtos alimentícios e se perpetuar (Tortora *et al.*, 2017).

Segundo Barancelli *et al.* (2011), no Brasil, os produtos lácteos são os principais contaminantes consumidos, em especial o leite cru, no qual a taxa de ocorrência varia de 0 a 37,8%. Ademais, destacam-se o presunto assado, produtos de carne e o sushi de salmão com altas taxas de ocorrência do patógeno. Os dados epidemiológicos referentes à doença listeriose no Brasil são escassos, evidenciando uma subnotificação de casos por motivos como a falta de procura médica e os altos custos da realização de um teste específico para a doença, considerando o tempo e dinheiro (Costa *et al.*, 2022). Além dos sintomas típicos da listeriose, em pacientes imunodeprimidos, idosos e gestantes, a bactéria pode chegar ao sistema nervoso central e causar meningite, sendo a quarta causa mais comum de meningite bacteriana, além de também provocar a sepse bacteriana, infecção do feto e até

mesmo o aborto ou bebê natimorto (Radoshevich e Cossart, 2018; Tortora *et al.*, 2017).

Figura 1. *L. monocytogenes* vista em microscópio óptico com aumento de 1000x.



Fonte: Autoral, 2024

2.2 Processo Infeccioso

A principal porta de entrada para a infecção por *L. monocytogenes* é a via oral, geralmente através do consumo de alimentos contaminados como hortaliças mal lavadas, ou laticínios e produtos frios que frequentemente são consumidos sem aquecimento prévio. (Barancelli *et al.*, 2011; Meloni, 2014). Depois que entra no organismo do hospedeiro, a bactéria precisa suportar a primeira linha de defesa do organismo: a acidez do suco gástrico; visto que pode crescer em um ambiente com pH entre 4,5 e 9,0, o uso de antiácidos pelo hospedeiro pode ser um risco para se tornar suscetível à infecção (Meloni, 2014; ; Santana, 2020; Tortora *et al.*, 2017).

Após passar pelo estômago, o patógeno irá se alojar nas células epiteliais do intestino através de uma endocitose mediada por receptor, entre a Internalina A (InA), InB e InC, e a E-caderina de enterócitos, hepatócitos e monócitos, respectivamente. A seguir, se espalha através de linfonodos para os órgãos-alvo, como baço e fígado. Uma vez disseminada pelo organismo, a *L. monocytogenes* enfrenta a segunda linha de defesa do corpo: as células fagocíticas; entretanto,

estas células podem ainda causar vantagem à disseminação da infecção e provocar um choque séptico (Radoshevich e Cossart, 2018; Tortora *et al.*, 2017).

Dentro de uma célula fagocítica, como o macrófago, a bactéria utiliza seus fatores patogênicos para escapar da morte. A utilização de listeriolisina O (LLO) e as fosfolipases A e B (PlcA e PlcB, respectivamente) garantem a ruptura do fagossomo, em que está aprisionado no macrófago, através de poros, e seu escape para o citoplasma da célula. Entretanto, a *L. monocytogenes* pode também residir no interior do vacúolo, replicando-se e utilizando como reservatório de células bacterianas; e, ainda, pode induzir a exocitose na célula hospedeira, para promover a sua disseminação. A partir dos fatores supracitados, o patógeno consegue se espalhar por todo o organismo, e, a depender do estado imunológico do hospedeiro, causar agravamento do quadro clínico (Dowd *et al.*, 2020; Murray *et al.*, 2017; Radoshevich e Cossart, 2018; Tortora *et al.*, 2017).

2.3 Resposta Imunológica

A resposta imunológica do hospedeiro acontece a partir do momento em que o patógeno consegue adentrar o trato gastrointestinal, nos enterócitos. (Murray *et al.*, 2017; Tortora *et al.*, 2017). O sistema imune inato é caracterizado por responder rapidamente à infecção a partir do momento que o organismo é invadido e o antígeno é localizado. Para tal, durante a inflamação, os componentes são ativados pelo contato com as proteínas presentes na sua membrana, os receptores semelhantes ao Toll (TLR), com componentes presentes no antígeno, os padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs); no caso da *L. monocytogenes*, reconhece-se a flagelina. Assim, os TLRs atuam como instigadores e reguladores da resposta imune (Coelho-Castelo *et al.*, 2009; Ferraz *et al.*, 2011; Tortora *et al.*, 2017).

As células fagocíticas possuem uma grande importância para a depuração de organismos invasores. Sendo assim, elas são as primeiras a se concentrarem no local de infecção, e são responsáveis pela liberação de citocinas pró-inflamatórias que auxiliam no recrutamento de outras células com função bactericida (Ferraz *et al.*, 2011). As principais citocinas são o Fator de Necrose Tumoral Alfa, a Interleucina-1, Interleucina-6 e Interleucina-12 (TNF- α , IL-1, IL-6 e IL-12, respectivamente), produzidas para fase inicial da inflamação através de macrófagos (Queiroz e Batista, 1999).

Quando a resposta imune inata não é suficiente para a neutralização do patógeno, o sistema imune adaptativo é acionado para conter a situação (Machado *et al.*, 2004). Os linfócitos T possuem diferentes funções e classes; assim, as células T auxiliares (Th ou T CD4+) desencadeiam uma série de reações para neutralização do antígeno. Os linfócitos Th1 e Th2 contribuem na liberação de citocinas como a Interferon Gama (IFN- γ), recrutando células Natural Killer (NK), T CD8 e fagócitos que também são células apresentadoras de antígenos (APCs); além da colaboração com linfócitos B para a formação de anticorpos, como a Imunoglobulina E (IgE) (Coelho-Castelo *et al.*, 2009; Cruvinel *et al.*, 2010; Machado *et al.*, 2004; Tortora *et al.*, 2017).

Ainda, as células TCD8 citotóxicas são importantes na lise da célula infectada através do Complexo Principal de Histocompatibilidade I (MHC I), visto que a bactéria possui a habilidade de escapar do fagossomo. Considerando que a *L. monocytogenes* é um patógeno oportunista que replica-se no interior das células do hospedeiro, os macrófagos também contribuem para a produção de óxido nítrico (NO), no qual possui um potencial citotóxico que destrói células invasoras. A ativação de células NK é outra aliada na destruição dos patógenos intracelulares; estimulada pela IL-12, a célula NK resulta na também estimulação de macrófagos através do IFN- γ , contribuindo para a atividade bactericida (Coelho-Castelo *et al.*, 2009; Cruvinel *et al.*, 2010; Machado *et al.*, 2004; Queiroz e Batista, 1999; Tortora *et al.*, 2017).

2.4 Lectinas vegetais

Os estudos com a utilização de lectinas têm pelo menos 130 anos, com a descoberta da ricina por Stillmark, em 1888, e seu potencial tóxico (Tsaneva e Van Damme, 2020). Desde então, há inúmeros relatos sobre o potencial das lectinas para diversas aplicações. As lectinas são consideradas bioativos que estão presentes em diversos organismos, sendo produzidas tanto em plantas quanto em animais (Mishra *et al.*, 2019).

Constituídas de proteínas e/ou glicoproteínas, possuem a habilidade de se ligar especificamente a carboidratos, de maneira reversível (Bellande *et al.*, 2017; Kumar *et al.*, 2012; Mishra *et al.*, 2019). Nas plantas auxiliam no processo de proteção contra patógenos, transporte e armazenamento de nutrientes e coordenação de suas atividades metabólicas. Podem ser encontradas

principalmente em sementes, raízes e folhas, sendo também importantes na comunicação entre células e na associação simbiótica da planta com os microrganismos fixadores de nitrogênio (Bellande *et al.*, 2017).

O potencial biotecnológico e modulador das lectinas vegetais têm sido relatados em pesquisas ao longo dos anos. A lectina de *Synadenium carinatum* apresentou propriedades anti-inflamatórias e anti-asmática (Rogério *et al.*, 2007), modulação da atividade fagocítica de macrófagos contra uma infecção por *Leishmania amazonensis* (Afonso-Cardozo *et al.*, 2011) e ação imunomoduladora sozinha e em conjunto com a lectina de *Artocarpus heterophyllus* contra uma infecção por *Toxoplasma gondii* (Souza *et al.*, 2016), todos em modelo murino. Ademais, também foram descritos potenciais antimicrobiano em tratamento preventivo com lectinas de *Canavalia brasiliensis* e *Cratylia argentea* (Silva *et al.*, 2016) e potencial anti-necrótico em um experimento de pancreatite aguda, com *Canavalia ensiformis* e *Canavalia brasiliensis* (Oliveira *et al.*, 2022).

2.5 *Cratylia argentea* e a lectina CFL

A *Cratylia argentea* (Desv.) O. Kuntze é uma leguminosa da família Fabaceae, nativa do Cerrado, é encontrada no Brasil nos estados do Mato Grosso, Goiás, Ceará, Piauí, Pará e Tocantins (De Queiroz *et al.*, 2015). É uma espécie arbustiva, forrageira, com bastante tolerância ao período de seca, permanecendo com folhagens verdes durante todo o ano, sendo assim, apontada como um recurso alimentar com grande potencial proteico para ruminantes em períodos de seca (Ibrahim *et al.*, 2001; Izaguirre-Flores e Martínez-Tinajero, 2007; Lascano *et al.*, 2002; Xavier; Carvalho; Botrel, 1995;).

A lectina de *C. argentea*, de sinônimo *C. floribunda*, denominada CFL, é uma hololectina, se liga a moléculas de manose ou glicose presente na superfície das células (Barral-Neto *et al.*, 1999; Calvete, 1992; Oliveira; Cavada; Moreira, 1991). O potencial biotecnológico da CFL foi testado ao longo dos anos, proporcionando resultados como a imunomodulação em ação bactericida de macrófagos contra *L. monocytogenes* (Santana *et al.*, 2022), reduziu a biomassa de *Klebsiella oxytoca* e a biomassa do biofilme de *Pseudomonas aeruginosa* (Vasconcelos *et al.*, 2014) e mostrou ação protetora e moduladora na atividade bactericida de macrófagos contra a infecção por *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (Batista *et al.*, 2017; Silva, 2014).

Figura 2. *C. argentea* fotografada em seu hábitat natural.



Fonte: Clélio Moura, 2021

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

Avaliar se a lectina de *Cratylia argentea* (CFL) influencia na fagocitose e destruição de *Listeria monocytogenes* e na resposta imune em camundongos Swiss (*Mus musculus* Linnaeus, 1758) infectados.

3.2 Específicos

- A) Verificar se a CFL possui influência na diminuição da carga bacteriana intracelular de macrófagos de camundongos Swiss infectados por *L. monocytogenes*;
- B) Determinar a concentração de inóculo adequado de *L. monocytogenes* em modelo de infecção intragástrica;
- C) Verificar se a CFL possui influência na diminuição da carga bacteriana em órgãos-alvo de camundongos infectados por *L. monocytogenes* através de infecção por via intragástrica;
- D) Verificar a eficácia do tratamento *in vivo* com CFL quando associada à gentamicina contra a *L. monocytogenes*;
- E) Identificar se a CFL possui uma influência na eficiência da resposta imune inata e adaptativa de camundongos Swiss infectados por *L. monocytogenes*.

4. METODOLOGIA

4.1 Animais

Foram obtidos camundongos fêmeas Swiss pesando 35 ± 5 g (4-6 semanas) do Biotério do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA) da Universidade Federal de Pernambuco. Todos os ensaios que envolveram experimentação animal possuíam aprovação do Comitê de Ética Experimental Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco (CEUA nº 1889260821). Os animais foram mantidos em biotério com controle de temperatura de ar controlada de 23-24 °C e ciclos de 12h claro / 12h escuro com livre acesso à água e ração durante todo o experimento.

4.2 Lectina

Amostras de *C. argentea* foram coletadas no Estado do Ceará e as lectinas foram obtidas com apoio da equipe do Prof. Márcio Viana Ramos da Universidade Federal do Ceará (UFC). A identificação taxonômica do material botânico foi confirmada por especialistas do Herbário Prisco Bezerra da UFC (Voucher nº 12.913; SISGEN AE9053B). A lectina foi purificada das sementes por cromatografia de afinidade em uma coluna de Sephadex G-50, seguindo o protocolo descrito por Oliveira, Cavada e Moreira (1991). Soluções estoque da lectina CFL foram preparadas em tampão fosfato-salino (PBS) e Roswell Park Memorial Institute (RPMI) para uso nos experimentos.

4.3 Microrganismo

Para infecção experimental, utilizamos uma cepa de *L. monocytogenes* (cepa 619) patogênica, isolada de um caso clínico humano, cedida pela pesquisadora Dra. Nilma Cintra Leal da FIOCRUZ/UFPE. As bactérias foram mantidas congeladas a -20°C em glicerol a 10%. Para uso nos experimentos as bactérias foram reativadas pela incubação overnight em caldo seletivo para *Listeria*. As culturas foram ajustadas em espectrofotômetro a 630 nm, considerando a densidade óptica de 0.5 correspondente a aproximadamente 2×10^9 células/mL.

4.4 Desenho experimental

4.4.1 Teste *in vitro*

A) Infecção experimental por *L. monocytogenes ex vivo*

Para a infecção, a suspensão bacteriana foi ajustada para duas concentrações: 1×10^5 e 2×10^5 Unidades Formadoras de Colônias por mililitro (UFC/mL), sendo injetado 200 μ L, via intraperitoneal, em dois animais para cada concentração. Após 24h do inóculo infeccioso, os camundongos infectados (n=4) e saudáveis (n=1) foram submetidos a eutanásia através da inalação por Isoflurano.

B) Coleta de amostras e tratamento

Para a coleta dos macrófagos peritoneais (pMØ), injetou-se 10 mL de RPMI na cavidade peritoneal dos animais. O abdômen foi massageado e, a seguir, o fluido peritoneal removido assepticamente e distribuído em placas de cultivo de 96 poços (200 μ L, 1×10^6 pMØ/poço). As placas foram incubadas em estufa a 37°C e 5% de CO₂ para fixação das células. Após 24h, o sobrenadante foi descartado e os poços adicionados de RPMI contendo 100 μ g/mL de gentamicina para eliminação de bactérias extracelulares. A seguir, após 1h, os poços foram tratados com CFL, como se segue: a lectina CFL foi dissolvida em RPMI contendo 10 μ g/mL de gentamicina. Foram utilizadas nove dosagens de CFL: 100 μ g/mL, 50 μ g/mL, 25 μ g/mL, 12,5 μ g/mL, 6,25 μ g/mL, 3,12 μ g/mL, 1,56 μ g/mL, 0,78 μ g/mL e 0,39 μ g/mL adicionadas aos poços. Após 24h de tratamento, os macrófagos foram avaliados para determinar a viabilidade celular e eliminação de bactérias intracelulares. Os grupos controles infectados foram tratados apenas RPMI, gentamicina (10 μ g/mL), e peróxido de hidrogênio (H₂O₂) por ser uma substância tóxica à célula; enquanto o grupo controle saudável recebeu apenas RPMI.

C) Análise de viabilidade celular

Para o teste de viabilidade celular, foi adicionado 20 μ L de resazurina por poço, sendo as placas incubadas na estufa a 37°C e 5% de CO₂ por 2-4 horas, seguido de leituras em espectrofotômetro a 570 e 600 nm para observação da redução de resazurina (azul) em resorufina (rosa) e confirmação das células metabolicamente ativas.

D) Quantificação bacteriana

Para quantificação de bactérias intracelulares, foi adicionado 200 μ L de Triton X-100 a 0,5% para lise dos macrófagos e liberação das bactérias fagocitadas. Após incubação de 20 minutos na geladeira, a suspensão celular passou por diluição

seriada e foi semeada pelo método *drop plate* em ágar *Mueller Hinton* (HIMEDIA®) por 24h a 37°C em estufa bacteriológica. Após esse período, foi quantificado o número de unidades formadoras de colônias de *L. monocytogenes* em todos os grupos experimentais e controles.

E) Protocolo

Os testes foram otimizados a partir dos protocolos descritos por Gonçalves e Mosser (2015) e Batista *et al.* (2017).

4.4.2 Teste de inóculo

A) Infecção intragástrica

Os animais (n=1) foram separados e submetidos a um jejum de 12h antes da infecção. Foi preparado e inoculado por gavagem 200 µL cinco concentrações de *L. monocytogenes*, 2×10^3 , 2×10^5 , 2×10^7 , 2×10^8 e 2×10^9 UFC/mL. Os animais foram observados e eutanasiados após um período de 5 dias.

B) Coleta de amostras e quantificação bacteriana

Após eutanásia, foram coletados, assepticamente, o sangue, através de punção cardíaca, baço e fígado. Os órgãos foram macerados em PBS estéril. Os homogeneizados de tecido, e o sangue, foram diluídos em PBS, semeados pelo método *drop plate* e as contagens bacterianas foram realizadas em placas de Petri contendo ágar PALCAM *Listeria* (Millipore®). Após 48h, foi quantificado o número de unidades formadoras de colônias de *L. monocytogenes* em todos os grupos.

C) Protocolo

O teste foi otimizado a partir dos protocolos descritos por Cabanes, Lecuit e Cossart (2008) e Walker *et al.* (2023).

4.4.3 Infecção experimental por *L. monocytogenes in vivo*

A) Infecção

Para a realização dos ensaios, os animais foram subdivididos nos seguintes grupos (n=8/grupo):

Controles:

- I. Animais infectados sem tratamento;
- II. Animais infectados e tratados com CFL;
- III. Animais infectados e tratados com gentamicina.

Experimentais:

- IV. Animais infectados e tratados com CFL 10 mg/kg + gentamicina;
- V. Animais infectados e tratados com CFL 1,0 mg/kg + gentamicina;

Os animais foram submetidos a um jejum de ração por 12 horas antes da infecção. Foi preparado e inoculado por gavagem 200 µL da concentração 2×10^9 UFC/mL de *L. monocytogenes*. Após a inoculação, foram mantidos em gaiolas com livre acesso à ração e água.

B) Tratamento

Os tratamentos foram administrados via intraperitoneal com volume de 200 µL após 24h do inóculo infeccioso, e se repetiu durante os 4 dias do desafio. O grupo I recebeu apenas solução salina tamponada com fosfato (PBS), os grupos II e III receberam a dose experimental com concentração de 10 mg/kg, e o último recebeu apenas a gentamicina. O grupo V recebeu a concentração de 1,0 mg/kg de CFL em conjuntura com gentamicina (10 mg/kg), enquanto o grupo VI recebeu a CFL 10 mg/kg em associação ao antibiótico 10 mg/kg. Posteriormente a 1 e 4 dias de tratamentos, os animais foram eutanasiados.

C) Coleta de amostras

A coleta das amostras foi realizada nos dias 1 e 4 após o início dos tratamentos, com metade dos animais de cada grupo (n=4). Foi retirado a amostra de sangue via punção de plexo retro orbital. Após, os animais foram eutanasiados através da inalação de Isoflurano (Isoforine®). Os órgãos como baço, fígado, intestino e linfonodos mesentéricos também foram recolhidos para a quantificação da carga bacteriana.

D) Quantificação bacteriana

Para quantificação da carga bacteriana no sangue e demais órgãos, foram macerados e realizadas diluições seriadas, no caso dos órgãos a partir da pesagem,

e foram semeados pelo método *drop plate* em ágar PALCAM *Listeria* por 48h a 37°C em estufa bacteriológica.

E) Contagem de leucócitos

Para contagem total de leucócitos no sangue periférico, 20 µL de sangue foram coletados via punção de plexo retro orbital, diluídos e homogeneizados em 380 µL de reagente de Turk. Uma alíquota desta solução foi submetida a contagem em câmara de Neubauer com auxílio de microscópio óptico. Para a contagem diferencial de leucócitos foi realizado um esfregaço corado com panótico rápido. Em seguida, os linfócitos, neutrófilos, basófilos, eosinófilos e monócitos foram contados em microscópio óptico.

F) Expressão gênica de citocinas

Para extração do RNA total, as frações de baço foram lavadas com PBS e, em seguida, maceradas e homogeneizadas com 400 µL de reagente TRIzol (Invitrogen) para lise química das células, seguindo o protocolo fornecido pelo fabricante. Após etapas de extração com clorofórmio e precipitação com isopropanol, a pureza do RNA foi confirmada no espectrofotômetro NanoDrop One (Thermo Scientific). As reações em RT-qPCR foram realizadas utilizando-se o kit One step SYBR® com M-MLV & hot-start Taq DNA Polymerase, conforme instruções do fabricante. As amplificações das citocinas Interleucina-1β (IL-1β), Interleucina-6 (IL-6), Interleucina-10 (IL-10), Óxido Nítrico Sintase induzível (iNOs) e Fator de Necrose Tumoral- α (TNF- α) foram analisadas com primers específicos e o controle interno de amplificação feito com Gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase (GAPDH), conforme Batista *et al.* (2017). A RT-qPCR foi feita nas seguintes condições: 10µL de SYBR Green, 2µL de primer F, 2µL de primer R, 2µL de RNA, 0,1µL de M-MLV RT e 3,9µL de água.

Tabela 1. Primers utilizados na amplificação de cDNA por meio de RT-qPCR.

Nome do gene	Sequência de primers
IL-1β	(F) TTGTCTAATGGGAACGTCACAC (R) TTGTCTAATGGGAACGTCACAC

IL-6	(F) TAATTCATATCTTCAACCAAGAGG (R) TGGTCCTTAGCCACTCCTTC
IL-10	(F) CATGGGTCTTGGGAAGAGAA (R) AACTGGCCACAGTTTTTCAGG
iNOS	(F) TGTGGCTACCACATTGAAGAA (R) TCATGATAACGTTTCTGGCTCTT
TNF- α	(F) ATTATGGCTCAGGGTCCAAC (R) AAAGCCCATTTGAGCCTTG
GAPDH	(F) TGGAGGGACTTATGACCACTG (R) AGAAGCAGGGATGATGTTCTG

Os resultados foram analisados segundo Dussault e Pouliot (2006), a partir da seguinte fórmula:

$$\Delta\Delta Ct = [(Ct_{GI_{\text{Controle}}} - Ct_{GAPDH_{\text{Controle}}}) - (Ct_{GI_{\text{Experimental}}} - Ct_{GAPDH_{\text{Experimental}}})]$$

No qual GI representa os valores de Ct (*Cycle threshold*) dos genes de interesse expressos no grupo experimental (infectados e tratados com CFL+Gentamicina); os resultados expressam a variação relativa aos grupos controles utilizando a fórmula $2^{\Delta\Delta Ct}$.

G) Protocolo

Os testes foram realizados a partir da otimização dos protocolos descritos por Cabanes, Lecuit e Cossart (2008), Gonçalves e Mosser (2015), Batista *et al.* (2017), Santana *et al.* (2022) e Walker *et al.* (2023).

4.5 Estatísticas

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 *Graphpad Prism* versão 8.1.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As plantas com ativos medicinais são consideradas uma das formas mais antigas na aplicação para a medicina e demais terapias. Sua atribuição à farmacologia é diversa, contendo propriedades antibacterianas, antifúngicas (Pessini *et al.*, 2003), antitumoral (Avelino-Flores *et al.*, 2019), entre outras.

Utilizando do princípio da fitoterapia para o tratamento experimental de listeriose, neste caso com a lectina CFL, no modelo de infecção com culturas de macrófagos infectadas com *L. monocytogenes* (cepa 619), experimentos *in vitro* foram realizados testando-se duas concentrações de inóculos bacterianos em macrófagos peritoneais obtidos de camundongos Swiss infectados com 1×10^5 UFC/mL e 2×10^5 UFC/mL. A seguir, as culturas foram tratadas com diferentes concentrações de CFL. A figura 3A mostra que não houve diferença na quantidade de bactérias dentro dos macrófagos nos grupos tratados com CFL em relação ao grupo controle RPMI, quando a infecção foi realizada com 1×10^5 UFC/mL. Apesar disso, a viabilidade de macrófagos tratados com CFL 100 $\mu\text{g/mL}$ se manteve elevada, comparando com os controles (Figura 3B).

Quando a inoculação foi realizada com 2×10^5 UFC/mL, a viabilidade celular dos macrófagos foi mais intensamente diminuída nos grupos tratados e controles (Figura 4A) de forma proporcional a quantidade de bactérias no ambiente intracelular, também mais elevada. Contudo, os tratamentos com CFL também tiveram efeito benéfico estimulando a depuração da *L. monocytogenes* no interior dos macrófagos infectados. Particularmente, os dados apontaram uma diferença significativa nas dosagens 100 e 50 $\mu\text{g/mL}$ de CLF em relação ao grupo RPMI, que foi infectado e não tratado; paralelamente, a dose 100 $\mu\text{g/mL}$ diferiu em relação ao grupo tratado com gentamicina (Figura 4B).

A CFL também foi utilizada para o tratamento experimental de salmonelose em culturas primárias de macrófagos murinos. Os experimentos descritos por Batista *et al.* (2017) mostraram que células que receberam o tratamento com a lectina, em esquemas de tratamento preventivo e curativo, obtiveram maior percentual de viabilidade e redução significativa da carga intracelular bacteriana, quando comparadas ao grupo controle. No presente estudo a análise da viabilidade dos macrófagos evidenciou que, apenas a dosagem de 100 $\mu\text{g/mL}$ de CFL teve efeito benéfico sobre as células infectadas. Assim, em conjuntura com os resultados

descritos por Batista e *al.* (2017), sugere-se que o tratamento possui um efeito benéfico contra a ação de microrganismos *in vitro*.

Figura 3. Quantificação bacteriana intracelular (A) e viabilidade (B) de macrófagos peritoneais infectados com *L. monocytogenes* com o inóculo de 1×10^5 UFC/ml

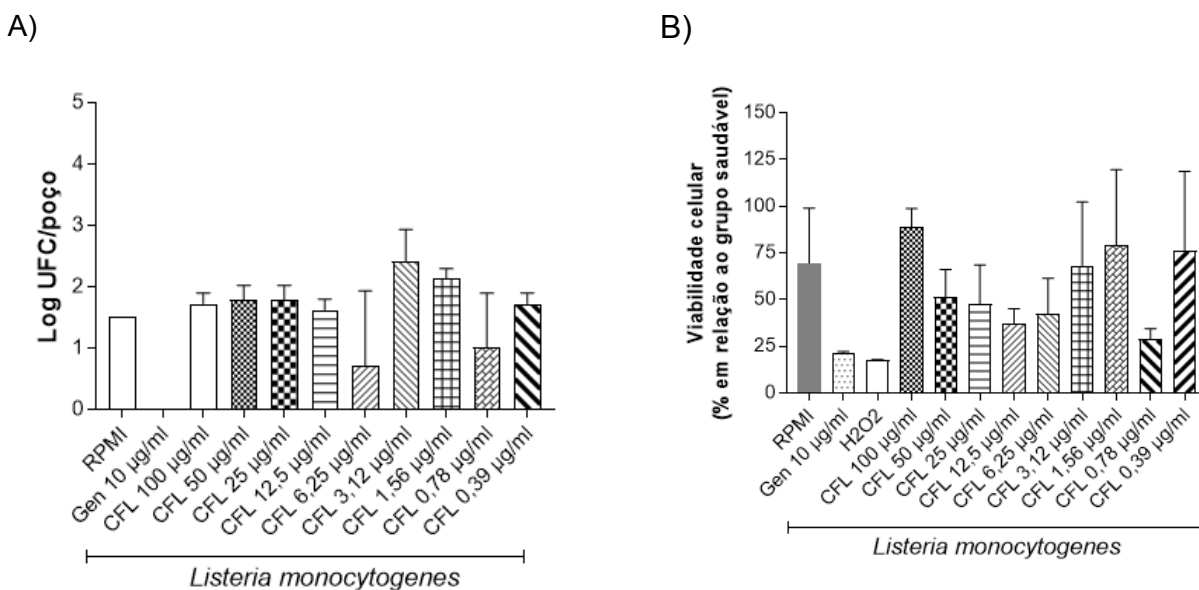
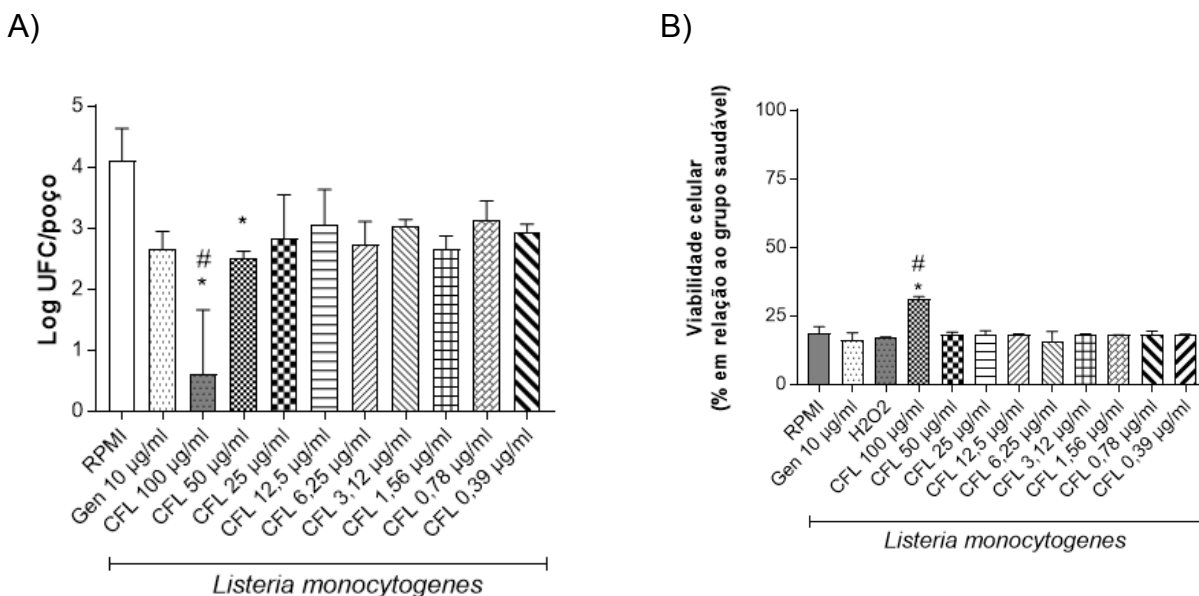


Figura 4. Quantificação bacteriana intracelular (A) e viabilidade (B) de macrófagos peritoneais infectados com *L. monocytogenes* com o inóculo de 2×10^5 UFC/ml



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

Para a otimização de um modelo de infecção intragástrica em camundongos, utilizamos cinco concentrações de inóculo para o teste de sobrevivência, 2×10^3 , 2×10^5 , 2×10^7 , 2×10^8 e 2×10^9 UFC/mL. Após os cinco dias de observação, nenhuma das concentrações se mostrou fatal para o animal. Além disso, apenas o inóculo com a concentração 2×10^9 UFC/mL apresentou os dados clínicos esperados de uma infecção, como piloereção, letargia e perda de peso. Portanto, o inóculo mais alto foi o considerado mais adequado para testes com infecção através do método de gavagem, sendo também o inóculo mais próximo do indicado por Cabanes, Lecuit e Cossart (2008) para experimentações com camundongo.

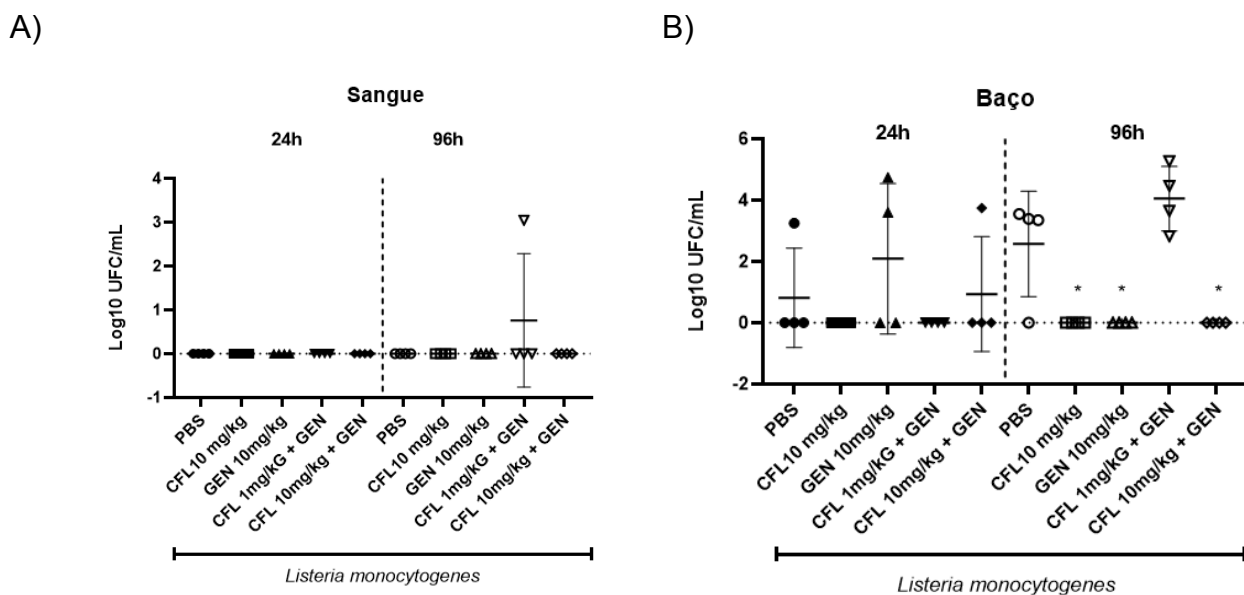
A partir do resultado anterior, o inóculo de 2×10^9 UFC/mL, via intragástrica, foi indicado para realização de experimentos com animais tratados com CFL. Neste caso, os animais foram submetidos a eutanásia após 24h e 96h para a coleta das amostras biológicas.

Para análise da carga bacteriana, amostras de sangue, linfonodo, baço e fígado foram quantificadas em ágar seletivo para *Listeria*. Após 24h de tratamento, não houve diferenças significativas na carga bacteriana no sangue e nos órgãos, embora a média quantificada nos animais tratados com CFL 10 mg/kg + gentamicina seja menor do que os demais grupos (Figura 5). Durante as próximas horas de tratamento, os animais apresentaram os sinais clínicos de infecção, como piloereção e letargia, provocando também o óbito de animais dos grupos tratados com PBS, gentamicina e CFL (10 mg/kg). Após as 96h de tratamento, a partir das análises, o baço e linfonodo tratados com CFL 10 mg/kg, CFL 10 mg/kg + gentamicina, gentamicina e CFL 1 mg/kg + gentamicina, apresentaram diferenças significativas na diminuição da carga bacteriana quando comparadas ao grupo tratado com PBS (Figura 5B e 5C).

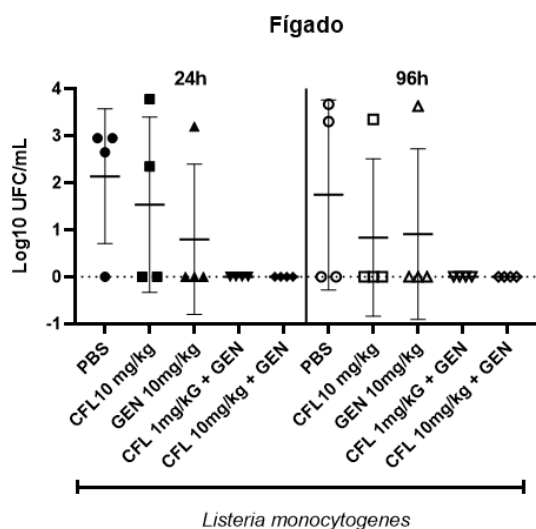
No sangue, a *L. monocytogenes*, praticamente não foi encontrada (Figura 5A). As células de Kupffer e os esplenócitos, residentes do fígado e baço, respectivamente, são as grandes responsáveis por retirar parte da carga da bactéria

da circulação sanguínea; neste experimento, é notável que a carga bacteriana ambos os órgãos possuem médias elevadas (Cousens e Wing, 2000; Murray *et al.*, 2017). Anteriormente, Batista *et al.* (2017) apontou que, em macrófagos infectados com *S. enterica*, esquemas de tratamento preventivo e curativo reduziram significativamente a carga intracelular da bactéria. Enquanto em infecções com *L. monocytogenes*, Santana *et al.* (2022) apontaram que macrófagos obtidos de camundongos tratados com 10 mg/kg de CFL produziram maior eliminação de bactérias intracelulares. No mesmo experimento, contagens bacterianas na corrente sanguínea, baço e fígado também foram diminuídas em comparação com o grupo PBS.

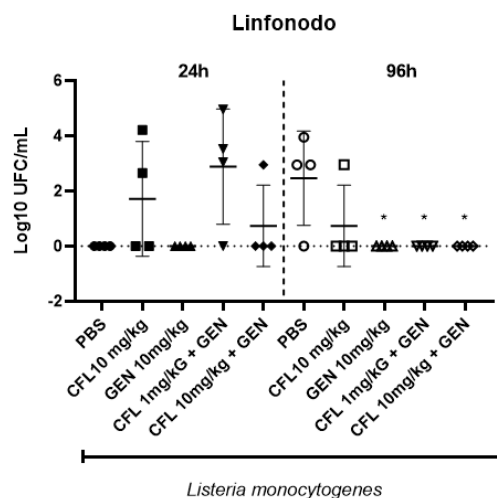
Figura 5. Quantificação bacteriana do sangue (A) e órgãos (B, C e D) de camundongos Swiss infectados por *L. monocytogenes* após 24h e 96h de tratamento



C)



D)



* indica diferença significativa em relação ao grupo controle tratado com PBS.

Após 24h, os grupos tratados apenas com gentamicina ou CFL associado a gentamicina, mostraram redução na quantidade de leucócitos no sangue (Tabela 1). A análise após 96h de tratamento mostrou que apenas os grupos tratados com CFL 10 mg/kg e CFL 1 mg/kg + gentamicina mostraram uma redução significativa na quantidade leucócitos (Tabela 2), sugerindo atividade anti-inflamatória. Na contagem diferencial, após 24h, houve uma redução de monócitos significativa nos grupos, quando comparados com o grupo infectado e não tratado. Ademais, após 96h, houve um aumento na quantidade de linfócitos, sugerindo ativação da imunidade adaptativa. Em experimentos anteriores, Silva *et al.* (2016) demonstrou que o tratamento prévio com CFL nos animais contra *Salmonella* com CFL via intraperitoneal, induziu um aumento no número de leucócitos após 3 dias de infecção, sendo maior do que os do grupo controle infectado e não tratado com CFL.

Comumente, o sistema imunológico do animal desencadeia uma inflamação aguda mais precocemente, frente a uma infecção, a fim de evitar a propagação do patógeno, junto com quimiocinas e citocinas como a interleucina-1 (IL-1). Contudo, esse tipo de resposta pode provocar o dano tecidual, devido à grande quantidade de leucócitos, principalmente neutrófilos, concentrados em um tecido, causando a sepse e até o óbito do animal (Murray *et al.*, 2017; Tortora *et al.*, 2017, p. 452-455).

Neste sentido, o recrutamento de leucócitos para o foco da infecção é um mecanismo apurado de defesa (Tabela 1), mas o controle da inflamação é necessário principalmente a longo prazo.

Tabela 2. Contagem total e diferencial de leucócitos no sangue dos animais infectados por *L. monocytogenes* após 24h de tratamento

Grupo	Leucócitos Totais (10 ³ /mm ³)	Contagem diferencial de Leucócitos (10 ³ /mm ³)			
		Neutrófilo	Linfócito	Monócito	Eosinófilo
PBS	2,68 ± 0,57	0,94 ± 0,71	1,5 ± 0,55	0,23 ± 0,09	0,00 ± 0,00
CFL (10 mg/kg)	2,7 ± 0,37	0,65 ± 0,43	1,92 ± 0,59	0,11 ± 0,05 *	0,00 ± 0,00
Gentamicina (10 mg/kg)	1,69 ± 0,17 *	1,59 ± 0,96	0,52 ± 0,3	0,01 ± 0,02 *	0,00 ± 0,00
CFL (1 mg/kg) + Gentamicina	1,5 ± 0,29 *	0,69 ± 0,46	0,77 ± 0,33	0,03 ± 0,01 *	0,00 ± 0,00
CFL (10 mg/kg) + Gentamicina	1,63 ± 0,44 *	0,93 ± 0,40	0,95 ± 0,51	0,01 ± 0,01 *	0,00 ± 0,00

* representa diferença significativa em relação ao grupo infectado tratado com PBS

Tabela 3. Contagem total e diferencial de leucócitos no sangue dos animais infectados por *L. monocytogenes* após 96h de tratamento

Grupo	Leucócitos Totais (10 ³ /mm ³)	Contagem diferencial de Leucócitos (10 ³ /mm ³)			
		Neutrófilo	Linfócito	Monócito	Eosinófilo
PBS	3,24 ± 0,14	1,29 ± 0,46	1,84 ± 0,34	0,06 ± 0,08	0,00 ± 0,00
CFL (10 mg/kg)	1,38 ± 0,35 *	0,32 ± 0,27	1,03 ± 0,06	0,02 ± 0,02	0,00 ± 0,00
Gentamicina (10 mg/kg)	3,42 ± 0,45	1,38 ± 1,48	1,86 ± 1,09	0,15 ± 0,04	0,00 ± 0,00

Grupo	Leucócitos Totais (10 ³ /mm ³)	Contagem diferencial de Leucócitos (10 ³ /mm ³)			
		Neutrófilo	Linfócito	Monócito	Eosinófilo
CFL (1 mg/kg) + Gentamicina	1,90 ± 0,54 *	1,69 ± 2,21	1,03 ± 0,49	0,05 ± 0,04	0,00 ± 0,00
CFL (10 mg/kg) + Gentamicina	3,48 ± 0,45	0,7 ± 0,43	2,92 ± 0,27 *	0,1 ± 0,05	0,00 ± 0,00

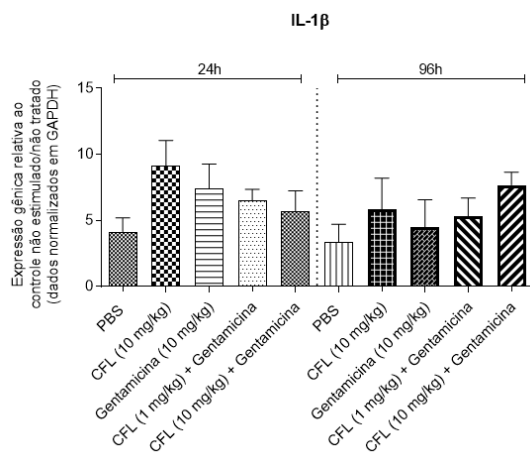
* representa diferença significativa em relação ao grupo infectado tratado com PBS

Com a ativação da resposta imune inata, macrófagos iniciam a liberação de citocinas pró-inflamatória a fim de neutralizar o patógeno. Neste estudo, foi analisado a expressão de citocinas como IL-1 β , IL-6, TNF- α , IL-10 e iNOS a partir de amostras do baço em reações de RT-qPCR. Como resultado, nos dois períodos de análises, o grupo tratado com CFL 10 mg/kg apresentou maior produção de transcritos de mRNA para as citocinas (Figura 6); e a indução de IL-1 β , importante no processo de pirogênese (D’Orazio, 2019), se manteve alta; enquanto as demais citocinas tiveram sua expressão diminuída, comparando entre os dois tempos de análises. Apesar disto, houve mais expressões de IL-10 em 24h após o tratamento (Figura 6D), indicando a regulação do processo inflamatório. Ademais, não houve indução para expressão de iNOS.

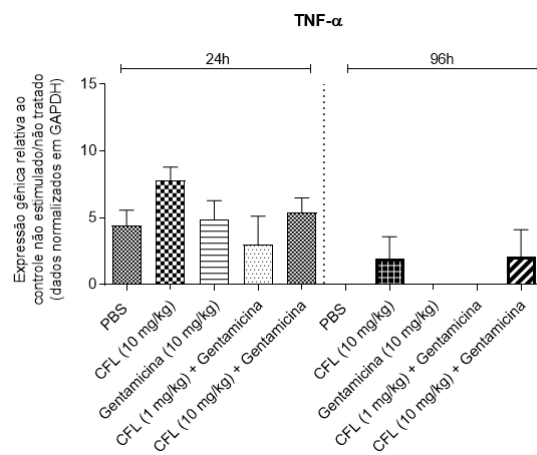
A Interleucina-6 e o Fator de Necrose Tumoral- α possuem papéis importantes na resposta imune ao processo infeccioso, para liberação e recrutamento de neutrófilos e aumento da atividade bactericida (D’Orazio, 2019). Em estudos anteriores com *L. monocytogenes*, Santana *et al.* (2022) mostraram que os tratamentos com a lectina de *C. argentea* influenciaram na produção de iNOS; contudo, Batista *et al.* (2017) mostraram que macrófagos infectados com *S. enterica* expostos a CFL lectinas no esquema preventivo apresentaram os transcritos de mRNA para IL-6 e TNF- α foram aumentados.

Figura 6. Expressão relativa das citocinas IL-1 β , TNF- α , IL-6 e IL-10 em amostras de cDNA de baço de camundongos infectados com *L. monocytogenes*, normalizados em GAPDH, em 24h e 96h após o tratamento

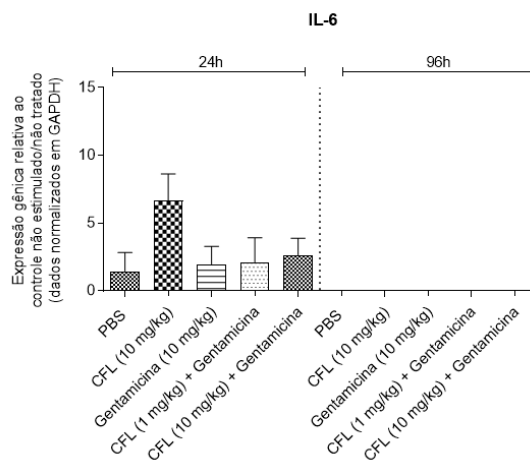
A)



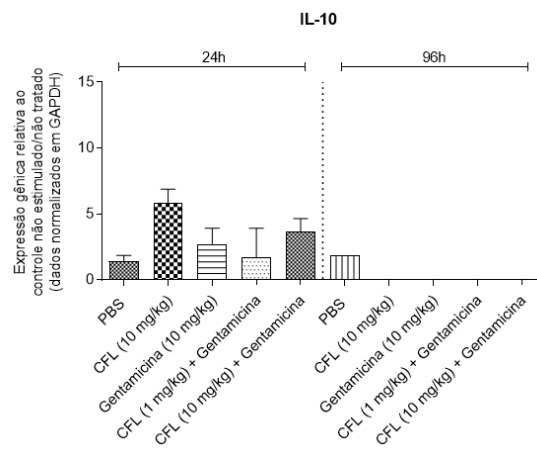
B)



C)



D)



6. CONCLUSÃO

Portanto, a lectina CFL, apesar de não possuir atividade antimicrobiana direta, os resultados deste trabalho sugerem que a CFL pode modular a atividade bactericida de macrófagos, aumentando também sua viabilidade após a infecção por *L. monocytogenes*; além disso, o seu potencial anti-inflamatório reduziu o recrutamento de leucócitos, a longo prazo, e regulou a indução da expressão de citocinas pró e anti-inflamatórias, nas primeiras horas de infecção, o que pode ser benéfico para impedir o choque séptico e dano tecidual. Entretanto, novos testes *in vivo* são necessários para melhores análises da influência da lectina contra a infecção e seu mecanismo de ação, de forma a demonstrar que formulações com a lectina CFL associada a diferentes antibióticos poderão se mostrar promissoras e a sua influência na diminuição da carga bacteriana da *L. monocytogenes* em órgãos-alvo será melhor avaliada.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AFONSO-CARDOZO, S. R. *et al.* Effect of the *Synadenium carinatum* latex lectin (ScLL) on *Leishmania (Leishmania) amazonensis* infection in murine macrophages. **Experimental parasitology**, v. 128, n. 1, p. 61–67, 2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **The top 10 causes of death**. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>>.

AVELINO-FLORES, M. C. G. *et al.* EVALUACIÓN in vitro DE LA ACTIVIDAD CITOTÓXICA Y ANTITUMORAL DE PLANTAS MEDICINALES RECOMENDADAS EN CUETZALAN DEL PROGRESO, PUEBLA, MÉXICO. **Polibotánica**, v. 0, n. 46, 1 jan. 2019.

BATISTA, JEC *et al.* Plant lectins ConBr and CFL modulate expression toll-like receptors, pro-inflammatory cytokines and reduce the bacterial burden in macrophages infected with *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. **Phytomedicine**, v. 25, p. 52-60, 2017.

BARRAL-NETO, M. *et al.* Human lymphocyte stimulation by legume lectins from the diocleae tribe. **Immunological Investigations**, v. 21, n. 4, p. 297–303, 1992.

BARANCELLI, G. V. *et al.* *LISTERIA MONOCYTOGENES*: OCORRÊNCIA EM PRODUTOS LÁCTEOS E SUAS IMPLICAÇÕES EM SAÚDE PÚBLICA. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 78, n. 1, p. 155–168, 2011.

BELLANDE, K. *et al.* Plant lectins and lectin receptor-like kinases: How do they sense the outside? **International journal of molecular sciences**, v. 18, n. 6, p. 1164, 2017.

CABANES, D.; LECUIT, M.; COSSART, P. Animal models of *Listeria* infection: Firmicutes (low G+C gram positive). **Current protocols in microbiology**, v. 10, n. 1, 2008.

CALVETE, J. J. *et al.* Molecular characterization and crystallization of Diocleinae lectins. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1430, p. 367–375, 1999.

CARVALHO, Irineide Teixeira. **Microbiologia dos alimentos/** Irineide Teixeira Carvalho. - Recife: EDUFRPE, 2010. 84 p.: il.

COELHO-CASTELO, A. A. M. *et al.* Resposta imune a doenças infecciosas. **Medicina (Ribeirão Preto Online)**, v. 42, n. 2, p. 127–142, 2009.

COSTA, P. V. *et al.* *Listeria monocytogenes*: challenges of microbiological control of food in Brazil. **Food Science and Technology**, v. 42, 2022.

COUSENS, L. P.; WING, E. J. Innate defenses in the liver during *Listeria* infection. **Immunological reviews**, v. 174, n. 1, p. 150–159, 2000.

CRUVINEL, W. DE M. *et al.* Sistema imunitário: Parte I. Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. **Revista brasileira de reumatologia**, v. 50, n. 4, p. 434–447, 2010.

DE QUEIROZ, L. P. *et al.* A multilocus phylogenetic analysis reveals the monophyly of a recircumscribed papilionoid legume tribe Diocleae with well-supported generic relationships. *Molecular phylogenetics and evolution*, v. 90, p. 1–19, 2015.

DOWD, G. C. *et al.* *Listeria monocytogenes* exploits host exocytosis to promote cell-to-cell spread. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 117, n. 7, p. 3789–3796, 2020.

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

D'ORAZIO, S. E. F. Innate and adaptive immune responses during *Listeria monocytogenes* infection. Em: **Gram-Positive Pathogens**. Washington, DC, USA: ASM Press, 2019. p. 803–835. DOI: 10.1128/9781683670131.ch51.

FARBER, J. M. *et al.* Alternative approaches to the risk management of *Listeria monocytogenes* in low risk foods. **Food control**, v. 123, n. 107601, p. 107601, 2021.

FERRAZ, E. G. *et al.* Receptores Toll-Like: ativação e regulação da resposta imune. **RGO**, v. 59, n. 3, p. 483–490, 2011.

Global Health Estimates: Life expectancy and leading causes of death and disability. Disponível em:

<https://www.who.int/data/gho/data/themes/mortality-and-global-health-estimates>. Acesso em: 13 jan. 2024.

GONÇALVES, R.; MOSSER, D. M. The isolation and characterization of Murine macrophages. **Current protocols in immunology**, v. 111, n. 1, 2015.

IBRAHIM, M., FRANCO, M., PEZO, D.A. *et al.* Promoting intake of *Cratylia argentea* as a dry season supplement for cattle grazing *Hyparrhenia rufa* in the subhumid tropics. **Agroforestry Systems** 51, 167–175 (2001).

IZAGUIRRE-FLORES, Fernando; MARTÍNEZ-TINAJERO, Jaime Jorge. "El uso de árboles multipropósito como alternativa para la producción animal sostenible". **Revista Tecnología en Marcha**, [S. l.], v. 21, n. 1, p. pág. 28–40, 2013. Disponível em: https://revistas.tec.ac.cr/index.php/tec_marcha/article/view/1336. Acesso em: 19 sep. 2024.

KUMAR, K. *et al.* Biological role of lectins: A review. **Journal of orofacial sciences**, v. 4, n. 1, p. 20, 2012.

LASCANO, C. E. *et al.* Cultivar veranera (*Cratylia argentea* (Desvaux) O. Kuntze): leguminosa arbustiva de usos múltiples para zonas con períodos prolongados de sequía en Colombia. **Relatório técnico**, 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.13140/2.1.3483.5202>. Acesso em: 19 set. 2024.

MACHADO, Paulo *et al.* Mecanismos de resposta imune às infecções. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 79, n. 6, p. 647-662, dez. 2004.

MELONI, D. Focusing on The Main Morphological and Physiological Characteristics of the Food-Borne Pathogen *Listeria monocytogenes*. **Journal of Veterinary Science and Research**, v. 1, n. 1, 2014.

MISHRA, A. *et al.* Structure-function and application of plant lectins in disease biology and immunity. **Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association**, v. 134, n. 110827, p. 110827, 2019.

MURRAY, Patrick R. e ROSENTHAL, Ken S. e PFALLER, Michael A. **Microbiologia Médica**. . Rio de Janeiro: Elsevier. 2017.

NETO, C. M. **Cratylia argentea**. Disponível em: <<https://www.inaturalist.org/observations/101646070>>. Acesso em: 10 out. 2024.

OLIVEIRA, Jaqueline Franciele Caetano de. **Lectinas vegetais: de moléculas de defesa de plantas às suas diversas aplicações biotecnológicas**. 2018. 62 f. Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Cascavel, 2018.

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

OLIVEIRA, S. R. B. D. *et al.* Anti-inflammatory and anti-necrotic effects of lectins from *Canavalia ensiformis* and *Canavalia brasiliensis* in experimental acute pancreatitis. **Glycoconjugate journal**, v. 39, n. 5, p. 599–608, 2022.

PESSINI, G. L. *et al.* Avaliação da atividade antibacteriana e antifúngica de extratos de plantas utilizados na medicina popular. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v. 13, supl. 1, 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2003000300009>. Acesso em: 19 ago. 2024.

QUEIROZ, S. L.; BATISTA, A. A. Funções biológicas do óxido nítrico. **Química nova**, v. 22, n. 4, p. 584–590, 1999.

RADOSHEVICH, L., COSSART, P. *Listeria monocytogenes*: towards a complete picture of its physiology and pathogenesis. **Nat Rev Microbiol** 16, 32–46 (2018). DOI: <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.126>.

RAMOS, E. L. P. *et al.* Lectins from *Synadenium carinatum* (ScLL) and *Artocarpus heterophyllus* (ArtinM) Are Able to Induce Beneficial Immunomodulatory Effects in a Murine Model for Treatment of *Toxoplasma gondii* Infection. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 6, 2016.

ROMAGNANI, S. Th1/Th2 cells. **Inflammatory Bowel Diseases**, v. 5, n. 4, p. 285–294, 2007.

ROGERIO, A. P. *et al.* Anti-asthmatic potential of a d-galactose-binding lectin from *Synadenium carinatum* latex. **Glycobiology**, v. 17, n. 8, p. 795–804, 2007.

SANTANA, Lucas Nunes *et al.* Anti-infective activity of *Cratylia argentea* lectin (CFL) against experimental infection with virulent *Listeria monocytogenes* in Swiss mice. **Phytomedicine**, v. 94, p. 153839, jan. 2022. DOI: 10.1016/j.phymed.2021.153839.

SANTANA, Lucas Nunes. **Potencial da Lectina CFL (*Cratylia argentea*) como adjuvante terapêutico em camundongos infectados com *Listeria monocytogenes***. 2020. 57 f. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.

SILVA, Ayrles Fernanda Brandão da. **Modulação imunológica preventiva aplicada ao controle de infecções bacterianas por *Salmonella typhimurium* pelo uso de lectinas**. 2014. 187 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2014.

SILVA, A. F. B. *et al.* Comparison of immunomodulatory properties of mannose-binding lectins from *Canavalia brasiliensis* and *Cratylia argentea* in a mice

model of *Salmonella* infection. **International immunopharmacology**, v. 31, p. 233–238, 2016.

TORTORA, Gerard J.; FUNKE, Berdell R; CASE, Christine L. **Microbiologia**. 12 Porto Alegre: Artmed, 2017].

TSANEVA, M.; VAN DAMME, E. J. M. 130 years of Plant Lectin Research. **Glycoconjugate journal**, v. 37, n. 5, p. 533–551, 2020.

VASCONCELOS, M. A. *et al.* Effect of Algae and Plant Lectins on Planktonic Growth and Biofilm Formation in Clinically Relevant Bacteria and Yeasts. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 1–9, 2014.

WALKER, G. T. *et al.* Murine models of *Salmonella* infection. **Current protocols**, v. 3, n. 7, 2023.

XAVIER, D. F.; CARVALHO, M. M.; BOTREL, M. DE A. **Cratylia argentea: informações preliminares para sua utilização como forrageira**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/142998/1/2034.pdf>>.

ZHANG, T. *et al.* Deciphering the landscape of host barriers to *Listeria monocytogenes* infection. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 114, n. 24, p. 6334–6339, 2017.