



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

JOYCE NAYARA GOMES DA SILVA

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL IMUNOMODULADOR DA LECTINA DE *Canavalia*
brasiliensis (CONBR) EM MODELO DE LISTERIOSE EXPERIMENTAL**

RECIFE

2024

JOYCE NAYARA GOMES DA SILVA

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL IMUNOMODULADOR DA LECTINA DE *Canavalia
brasiliensis* (CONBR) EM MODELO DE LISTERIOSE EXPERIMENTAL**

Monografia apresentada como Trabalho de Conclusão de Curso como parte dos requisitos para obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas pela Universidade Federal Rural de Pernambuco.

Orientador: Prof. Dr. José Vitor Moreira
Lima Filho

Coorientadora: Me. Kássia Regina da
Silva Carneiro

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)

- S586a Silva, Joyce Nayara Gomes da
Avaliação do potencial imunomodulador da lectina de *Canavalia brasiliensis* (ConBr) em modelo de listeriose experimental / Joyce Nayara Gomes da Silva. - 2024.
44 f.
- Orientador: Jose Vitor Moreira Lima Filho.
Coorientadora: Kassia Regina da Silva Carneiro.
Inclui referências.
- Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal Rural de Pernambuco,
Bacharelado em Ciências Biológicas, Recife, 2024.
1. Lectina. 2. ConBr. 3. Listeriose. 4. infecção. 5. Imunoterapêutico. I. Filho, Jose Vitor Moreira Lima, orient. II. Carneiro, Kassia Regina da Silva, coorient. III. Título

JOYCE NAYARA GOMES DA SILVA

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL IMUNOMODULADOR DA LECTINA DE *Canavalia
brasiliensis* (CONBR) EM MODELO DE LISTERIOSE EXPERIMENTAL**

BANCA EXAMINADORA

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

Profa. Dra. Anna Carolina Soares Almeida
Departamento de Biologia – UFRPE
(Membro interno)

Dra. Betty Mancebo Dorvigny
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)
(Membro externo)

Profa. Dra. Yone Vila Nova Calvalcanti
Departamento de Biologia – UFRPE
(Suplente)

AGRADECIMENTOS

A todos que integram a Universidade Federal Rural de Pernambuco, incluindo zeladores, seguranças, coordenadores, técnicos e professores, por fazerem dessa universidade um espaço seguro, acolhedor e de grandes aprendizados. Especialmente, ao Departamento de Biologia pelas oportunidades fornecidas.

Ao meu orientador, Prof. Dr. José Vítor Moreira Lima Filho, por ter me dado a oportunidade de fazer parte do laboratório. Agradeço pela paciência, orientação e confiança depositada em mim durante a graduação.

À minha coorientadora, Me. Kássia Regina da Silva Carneiro, pela ajuda incondicional na realização dos experimentos, e por suas orientações não apenas para este trabalho, mas também para minha jornada profissional. Agradeço ainda pelas suas sugestões, incentivo e paciência.

Aos integrantes do Laboratório de Microbiologia e Imunologia (LAMIM), Rose, Islana, Esther, Lucas, Victor e Isabela por me acolherem tão bem, pelos momentos de incentivo, alegria e aprendizado, e por toda ajuda durante os experimentos.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo fomento.

À Dra. Nilma Cintra Leal (FIOCRUZ-PE), ao Prof. Dr. Márcio Viana Ramos (UFC) e a Dra. Maria Helena Ribeiro (LIKA/UFPE), pela disponibilização do material biológico utilizado neste trabalho.

À Isabel e Bruno Krichna, pelo apoio, sem o qual não conseguiria iniciar essa graduação, e por isso, sou imensamente grata.

Aos meus queridos colegas e amigos da turma SB1 (2019.2) pelos momentos de amizade e companheirismo, que sempre me rendem boas lembranças.

Aos meus pais e minha irmã, pelo apoio durante o período de graduação. Às minhas três gatinhas, pelo amor incondicional. Aos meus avós, tios e primos, que de forma direta ou indireta contribuíram para realização de mais um sonho.

A todos, minha sincera gratidão!

RESUMO

Lectinas vegetais estão envolvidas em inúmeras atividades biológicas relacionadas ao reconhecimento e ligação a carboidratos específicos na superfície de células. A lectina ConBr, extraída das sementes da leguminosa *Canavalia brasiliensis*, vem sendo estudada devido suas propriedades terapêuticas, incluindo a capacidade de modular a resposta imune. Tendo em vista que a saúde humana é constantemente desafiada por uma variedade de ameaças, como inflamações e infecções causadas por patógenos, os quais facilmente adquirem resistência aos medicamentos antimicrobianos, é imprescindível o estudo e desenvolvimento de novas formulações imunoterapêuticas. Um exemplo preocupante desse cenário é a infecção por *Listeria monocytogenes*, uma bactéria patogênica, com capacidade de causar graves infecções em diversas espécies de animais, incluindo seres humanos. Nesse sentido, o objetivo desse trabalho foi investigar o potencial imunomodulador da lectina ConBr diante da infecção experimental por *L. monocytogenes*. Para tanto, camundongos *Swiss* foram administrados, via intraperitoneal, com carragenina, um agente indutor da peritonite, ou *L. monocytogenes*. Após 30 min, foi realizada a administração endovenosa de ConBr (1 e 10 mg/kg) de forma a verificar sua influência sobre a regulação do recrutamento de leucócitos ao peritônio e processo inflamatório. Os grupos controles receberam dexametasona, gentamicina ou tampão salina-fosfato (PBS). Todos os camundongos foram submetidos a eutanásia após 6 horas de tratamento. Foram coletados sangue e fluido peritoneal para quantificação de leucócitos. Nos animais infectados foram quantificadas unidades formadoras de colônias (UFC) em diferentes tecidos e órgãos e coletados macrófagos peritoneais para análise de viabilidade celular. Os resultados apontaram que, no modelo de inflamação experimental por carragenina, a ConBr induziu o aumento da infiltração leucocitária no fluido peritoneal dos camundongos tratados, embora os níveis de expressão gênica de citocinas inflamatórias no baço dos animais tenham sido semelhantes entre grupos controles e experimentais. No modelo de infecção por *L. monocytogenes*, a administração endovenosa de ConBr não foi capaz de influenciar a contagem de leucócitos totais e diferenciais no fluido peritoneal e sangue de animais infectados. Ademais, os tratamentos com a lectina não aumentaram a viabilidade celular dos macrófagos nem reduziram a contagem bacteriana no sangue, fluido peritoneal, baço e fígado, após 6 horas de tratamento. Concluímos que, apesar dos resultados obtidos nos testes com carragenina apontassem para um potencial imunomodulador da lectina ConBr, não foi possível verificar esses mesmos efeitos nos testes realizados com o modelo de infecção por *Listeria monocytogenes*.

Palavras-chave: Lectina, ConBr, listeriose, infecção, imunoterapêutico.

ABSTRACT

Plant lectins are involved in numerous biological activities related to the recognition and binding to specific carbohydrates on the cell surface. The ConBr lectin, extracted from the seeds of the legume *Canavalia brasiliensis*, has been studied due to its therapeutic properties, including the ability to modulate the immune response. Considering that human health is constantly challenged by a variety of threats, such as inflammation and infections caused by pathogens, which can easily acquire resistance to antimicrobial drugs, it is necessary to study and develop new immunotherapeutic formulations. A worrying example of this scenario is infection by *Listeria monocytogenes*, a pathogenic bacterium capable of causing serious infections in several species of animals, including humans. In this sense, the objective of this work was to investigate the immunomodulatory potential of the ConBr lectin in the murine model of listeriosis. For this, Swiss mice were administered intraperitoneally with carrageenan, a peritonitis-inducing agent, or *L. monocytogenes*. After 30 min, intravenous administration of ConBr (1 and 10 mg/kg) was performed to verify its influence on the regulation of leukocyte recruitment to the peritoneum and the inflammatory process. Control groups received dexamethasone, gentamicin or phosphate saline (PBS). All mice were euthanized after 6 hours of treatment. Blood and peritoneal fluid were collected for leukocyte quantification. In infected animals, colony forming units (CFU) were quantified in different tissues and organs and infected peritoneal macrophages were collected for analysis of cell viability. The results showed that, in the experimental inflammation model using carrageenan, ConBr induced an increase in leukocyte infiltration in the peritoneal fluid of treated mice, although the gene expression levels of inflammatory cytokines were similar between control and experimental groups. In the *L. monocytogenes* infection model, intravenous administration of ConBr was not able to influence the total and differential leukocyte counts in the peritoneal fluid and blood of infected animals. Furthermore, lectin treatments did not increase cellular protection of macrophages or reduce bacterial counts in blood, peritoneal fluid, spleen and liver after 6 hours of treatment. We conclude that, although the results obtained in tests with carrageenan point to an immunomodulatory potential of the ConBr lectin, it was not possible to verify these same effects in tests carried out with the *Listeria monocytogenes* infection model.

Keywords: Lectin, ConBr, listeriosis, infection, immunotherapeutic.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. <i>Canavalia brasiliensis</i>	15
FIGURA 2. Expressão gênica de mediadores inflamatórios IL-1 β (A), IL-10 (B) e TNF- α (C) em animais inflamados com carragenina e tratados com ConBr após 6 horas.....	28
FIGURA 3. Viabilidade celular de pM \emptyset de camundongos <i>Swiss</i> tratados com ConBr (1 e 10 mg/kg) após a infecção por <i>L. monocytogenes</i>	30
FIGURA 4. Quantificação de UFC de <i>L. monocytogenes</i> após tratamento de 6 horas com ConBr (1 e 10mg/kg) no sangue (A), fluído peritoneal (B), baço (C) e fígado (D) de camundongos <i>Swiss</i>	33

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Primers utilizados para realização da amplificação de cDNA por meio de RT-qPCR.....24

TABELA 2 – Contagem total e diferencial de leucócitos em camundongos *Swiss* após 6 horas de tratamento contra inflamação induzida por carragenina.....27

TABELA 3 – Contagem total e diferencial de leucócitos em camundongos *Swiss* após 6 horas de tratamento contra infecção por *Listeria monocytogenes*.....32

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µL – Microlitro

µm – Micrometro

ANOVA – Análise de variância

CAR – Carragenina

cDNA – Ácido desoxirribonucleico complementar

CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais

ConBr – Lectina de *Canavalia brasiliensis*

Ct – *Cycle threshold*

Dexa – Dexametasona

FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz

g – Grama

Gen – Gentamicina

IL-1β – Interleucina 1 beta

IL-4 – Interleucina 4

IL-6 – Interleucina 6

IL-8 – Interleucina 8

IL-10 – Interleucina 10

IL-13 – Interleucina 13

kg – Quilograma

LAMIM – Laboratório de Microbiologia e Imunologia

LIKA – Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami

mg – Miligrama

mL – Mililitro

NaCl – Cloreto de sódio

NO – Oxido nítrico

nm – Nanômetros

°C – Graus Celsius

PBS – Tampão fosfato-salino

pH – Potencial hidrogênico

pMØ – Macrófagos peritoneais

RNA – Ácido ribonucleico

RNA_m – Ácido ribonucleico mensageiro

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

TGF- β – Fator de crescimento transformador beta

TNF- α – Fator de necrose tumoral alfa

UBC – Ubiquitina C

UFC – Unidades Formadoras de Colônias

UFC – Universidade do Ceará

UFPE – Universidade Federal de Pernambuco

UFRPE – Universidade Federal Rural de Pernambuco

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. REVISÃO DA LITERATURA	13
2.1 Lectinas Vegetais	13
2.1.1 Lectina de <i>Canavalia brasiliensis</i> (ConBr).....	14
2.1.2 Potencial imunomodulatório da ConBr.....	15
2.2 Resposta inflamatória	16
2.3 Carragenina	17
2.3.1 Indução da inflamação pela carragenina.....	17
2.4 <i>Listeria monocytogenes</i>	17
2.4.1 Modelo de infecção por <i>L. monocytogenes</i>	19
3. OBJETIVOS	19
3.1 Objetivo geral.....	19
3.2 Objetivos específicos.....	19
4. MATERIAS E MÉTODOS	20
4.1 Materiais.....	20
4.2 Animais.....	20
4.3 Microrganismo.....	21
4.4 Inflamação experimental <i>in vivo</i> com carragenina.....	21
4.5 Infecção experimental <i>in vivo</i> com <i>L. monocytogenes</i>	22
4.6 Viabilidade de macrófagos infectados.....	22
4.7 Quantificação bacteriana.....	23
4.8 Contagem total e diferencial de leucócitos	23
4.9 Expressão gênica de mediadores inflamatórios.....	23
4.10 Análise estatística.....	24
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
6. CONCLUSÃO	34
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	35

1. INTRODUÇÃO

Proteínas de origem vegetal têm desempenhado um papel importante no avanço das inovações terapêuticas, sendo uma alternativa para a busca de novos compostos com propriedades farmacológicas (Coelho *et al.*, 2017). Uma variedade de substâncias bioativas, como lectinas vegetais, tem demonstrado atividade imunomoduladora (Souza *et al.*, 2013; Carneiro *et al.*, 2021). Sendo capazes de promover a imunoestimulação ou imunossupressão da resposta imune, de forma que resulte no reparo da função fisiológica (Araújo *et al.*, 2013; Santos *et al.*, 2020).

As propriedades imunomoduladoras das lectinas vegetais provêm da interação específica com carboidratos presentes nas superfícies de células imunes, promovendo uma cascata de transdução de sinais para a produção de citocinas (Katrlik *et al.*, 2010, Coriolano *et al.*, 2018). Por meio desse mecanismo, as lectinas desencadeiam efeitos significativos no contexto da infecção, ao potencializar a eliminação de agentes patogênicos através da regulação leucocitária e aumento da capacidade fagocítica das células imunes (Campos *et al.*, 2016; Melo *et al.*, 2011).

Listeria monocytogenes, é um exemplo de bactéria patogênica com capacidade de causar infecções graves e sistêmicas (Lecuit, 2020). A listeriose, doença infecciosa, causada pela ingestão de alimentos contaminados por *L. monocytogenes*, acomete humanos e animais, com uma taxa de mortalidade de até 30% dos casos (Materke e Okoh, 2020). O tratamento padrão para listeriose é baseado no uso de antibióticos, no entanto, existem riscos clínicos de falhas associadas à resistência antimicrobiana (Baquero *et al.*, 2020). Nesse viés, biomoléculas com propriedades imunomodulatórias, são potenciais fontes de novas formulações para o desenvolvimento de medicamentos contra infecções bacterianas.

Assim, as lectinas vegetais são proteínas de interesse, e que podem ser utilizadas como adjuvantes imunes capazes de regular mediadores inflamatórios envolvidos na resposta imunológica (Barboza *et al.*, 2017). Estudos anteriores apontam para a atividade imunorreguladora da lectina de *Canavalia brasiliensis* (ConBr) em modelos de infecção e inflamação experimental (Batista *et al.*, 2017; Oliveira *et al.*, 2022). Diante disso, o presente estudo procurou investigar o potencial imunomodulador da lectina ConBr frente a infecção experimental por *Listeria monocytogenes* em camundongos Swiss.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Lectinas Vegetais

Lectinas são proteínas que possuem um domínio de reconhecimento de carboidratos, de origem não imune, que podem ligar-se a carboidratos simples ou complexos de forma reversível e altamente específica (Lagarda-Diaz *et al.*, 2017). Elas são produzidas por diversos organismos vivos, e podem ser agrupadas de acordo com suas espécies de origem, como lectinas algais, fúngicas, bacterianas, animais e vegetais (Mishra *et al.*, 2019).

As lectinas vegetais foram as primeiras proteínas a serem estudadas, sendo extensivamente investigadas devido à vasta distribuição e facilidade de isolamento (Katoch; Tripathi, 2021). Elas são encontradas em muitos grupos de plantas, incluindo mono e eudicotiledôneas, e com frequência isoladas das famílias Leguminosae e Euphorbiaceae (Dias *et al.*, 2015). As lectinas se distribuem por vários tecidos vegetais, embora sejam extraídas sobretudo de sementes (Cavada *et al.*, 2020), raízes (Silva *et al.*, 2019) e folhas (Silva *et al.*, 2021).

Nas plantas, elas desempenham diversas funções biológicas, em especial, relacionadas a ação de defesa contra microrganismos e na sinalização de danos que podem ser causados na superfície celular e/ou intracelular dos organismos vegetais (Oliveira, 2018). O mecanismo de defesa induzido por essas biomoléculas ocorre através da interação lectina-carboidrato, no qual as lectinas possuem pelo menos um domínio não catalítico que possibilita sua ligação seletiva a carboidratos específicos presentes na superfície celular do patógeno, desencadeando a transdução de sinal intracelular e conseqüentemente a resposta fisiológica (Lannoo; Van Damme, 2014).

As propriedades químicas e biológicas das lectinas vegetais têm despertado grande interesse científico, devido a atuação dessas proteínas como mediadoras nos mecanismos de interação e de reconhecimento celular, visto que tais processos são dependentes de glicídios (Silva *et al.*, 2022). Várias lectinas vegetais têm sido estudadas como potenciais alternativas para a produção de novos antimicrobianos, em função da sua interação com carboidratos presentes na parede celular bacteriana (Breitenbach *et al.*, 2018; Enoma *et al.*, 2023). Desse modo, as lectinas vegetais têm demonstrado habilidade de influenciar a interação patógeno-hospedeiro, sinalização e desenvolvimento celular e comunicação célula-célula (Iordache *et al.*, 2015).

2.1.1 Lectina de *Canavalia brasiliensis* (ConBr)

A *Canavalia brasiliensis* Mart. ex Benth. é uma leguminosa pertencente à família Fabaceae, que apresenta folhas alternadas e trifoliadas, com flores de coloração roxa e pétalas perfumadas (Figura 1). É uma planta herbácea, de crescimento prostrado, que pode atingir até 5m de comprimento, e é conhecida popularmente no Brasil como “feijão bravo-do-Ceará” (Sales Guedes *et al.*, 2009). Devido ao seu sistema radicular robusto, que favorece a captação de água e nutrientes em camadas mais profundas do solo, apresenta grande potencial de produção de biomassa e resistência em meio a períodos de escassez hídrica (Sodré Filho *et al.*, 2004). Além disso, possui ampla distribuição geográfica, presente na maioria dos estados brasileiros e em diversos países da América Latina (Silva, 2012).

A lectina ConBr, extraída das sementes de *Canavalia brasilienses*, foi isolada pela primeira vez por precipitação fracionada com sulfato de amônio seguida de cromatografia de afinidade em coluna de Sephadex G-50 (Moreira; Cavada, 1984). É caracterizada pela especificidade de ligação para resíduos de D-glicose e D-manose, e apresenta Ca^{+2} e Mn^{+2} em sua estrutura (Silva *et al.*, 2011). A ConBr possui 237 resíduos de aminoácidos e 99% de similaridade de estrutura primária com a lectina de *Canavalia ensiformis* (ConA), com apenas dois resíduos de aminoácidos que diferem da ConA (Cavada *et al.*, 2019). Um único monômero de ConBr é constituído de um polipeptídeo 30KDa (cadeia α) e fragmentos pequenos de 16KDa e 12KDa (cadeias β e γ , respectivamente), porém, a estrutura molecular de ConBr também pode variar em dímero e tetrâmero, dependendo do pH (Grangeiro *et al.*, 1997).

A afinidade da ConBr a carboidratos específicos está diretamente relacionada ao design do sítio de ligação de carboidratos presente na lectina, com isso, diferentes distâncias entre aminoácidos específicos resultam em múltiplas atividades biológicas promovidas pela lectina (Bezerra *et al.*, 2011). A interação da ConBr com receptores glicídicos da membrana celular animal, resulta em uma variedade de mudanças na célula capaz de induzir alterações no metabolismo (Silva, 2014). Nesse sentido, foram atribuídas a ConBr diversas propriedades biologicamente efetoras, como ação imunomodulatória e antimicrobiana (Batista *et al.*, 2017), indução de apoptose celular e efeito antitumoral (Wolin *et al.*, 2021), ação antiviral (Gondim *et al.*, 2019), efeitos anti-inflamatórios e antinecróticos (Oliveira *et al.*, 2022).

Figura 1. *Canavalia brasiliensis*



Fonte: Google Imagens

2.1.2 Potencial imunomodulatório da ConBr

A ConBr tem demonstrado influência no controle de infecções através da modulação da resposta imunológica do hospedeiro. Em um modelo experimental de infecção por *Salmonella* Typhimurium, Silva *et al.*, (2016), avaliaram as atividades imunomoduladoras da ConBr utilizando camundongos *Swiss*. Os autores relataram que a ConBr, foi capaz de induzir a migração de leucócitos para cavidade peritoneal dos camundongos tratados no primeiro dia de infecção e que se manteve até o terceiro dia. Ademais, o pré-tratamento com ConBr foi capaz de reduzir a expressão e quantidades de IL-10 e TNF- α no líquido peritoneal de camundongos infectados, sugerindo que a ConBr poderia potencialmente ser aplicada no manejo de distúrbios inflamatórios derivados de infecções.

Em estudo semelhante, Batista *et al.*, (2017) realizaram experimentos com macrófagos peritoneais, previamente expostos à ConBr, e infectados por *Salmonella*, demonstrando que o tratamento prévio aumentou o nível de transcritos de IL-6 e IL-12. No tratamento após a exposição à *Salmonella*, observaram que além de reduzir a quantificação bacteriana intracelular em macrófagos, a ConBr induziu o aumento da expressão gênica de IL-1 β e TNF- α . Dessa forma, demonstraram que o tratamento com ConBr, seja antes ou após a infecção, foi capaz de influenciar a liberação de citocinas pró-inflamatórias, que desempenham um papel chave na regulação da resposta imune do hospedeiro, ao limitar a propagação bacteriana.

2.2 Resposta inflamatória

O sistema imunológico é composto por órgãos, células e moléculas ativas distribuídas por todo o organismo, e caracteriza-se pela habilidade de reconhecimento específico à determinadas estruturas moleculares e/ou antígenos, promovendo resposta efetora (Cruvinel *et al.*, 2010). Um aspecto fundamental desse processo é a inflamação, reação complexa ativada em situações de lesão, infecção, irritação ou necrose tecidual, que apresenta sinais cardinais característicos: dor, rubor, calor e edema (De Paulo *et al.*, 2010). A progressão da reação inflamatória envolve células imunes, vasos sanguíneos e a liberação de substâncias químicas como citocinas, quimiocinas e proteínas de sinalização celular (Etienne; Viegas; Viegas Jr., 2021).

As citocinas, importantes mediadores químicos da inflamação, são proteínas multifuncionais liberadas por células como macrófagos, monócitos, linfócitos e mastócitos (Zhang; An, 2007). Algumas citocinas exercem ações pró-inflamatórias sendo responsáveis pela eliminação das lesões, como as interleucinas IL-1 β , IL-6, IL-8, e o TNF- α (Fator de necrose tumoral alfa). Já as citocinas anti-inflamatórias, como IL-10, IL-4, IL-13, e o TGF- β (Fator de crescimento transformador beta) têm a função de modular a inflamação, promovendo a resolução do processo inflamatório e prevenindo danos teciduais excessivos (Oliveira *et al.*, 2011). Todas as citocinas atuam a partir de receptores de superfície expressos pelas células-alvo para ativar ou inibir cascatas da transcrição gênica, regulando a produção de outras citocinas e proliferação de células imunológicas (Kraychete; Calasans; Valente, 2006).

A ativação de mediadores inflamatórios, como as citocinas, provoca vasodilatação, e eleva a permeabilidade vascular, permitindo que proteínas e leucócitos extravasem para os tecidos (Kolaczowska; Kubes, 2013). Essa migração leucocitária através da parede dos vasos sanguíneos, ocorre seguindo gradientes de quimiocinas liberadas por células lesadas, no ambiente circundante (Alon; Shulman 2011). Assim, as células efetoras como neutrófilos, monócitos e células T são coordenadas para eliminar patógenos por meio da fagocitose, remover células danificadas e promover a reparação tecidual (Nourshargh; Alon, 2014). Contudo, é necessário a atuação de mecanismos reguladores da resposta inflamatória, como citocinas anti-inflamatórias, para evitar que a atividade excessiva dessas células resulte em mais danos aos tecidos (Medzhitov, 2021).

2.3 Carragenina

A carragenina é um polissacarídeo sulfatado de β -D-galactose e 3,6-anidro-D-galactose, obtido pela extração de algas marinhas vermelhas (Rhodophyceae), principalmente da espécie *Chondrus crispus* (Bahari *et al.*, 2021; Song *et al.*, 2022). As carrageninas, em geral, são empregadas como aditivos para produtos alimentares, sendo utilizados como agente geleificante, emulsionante, estabilizante, suspensor e de aumento de viscosidade (Brasil, 2019). Além dessas funções, as carrageninas são usadas em medicina experimental, formulações farmacêuticas, cosméticos e aplicações industriais (Necas e Bartosikova, 2013).

2.3.1 Indução da inflamação pela carragenina

A carragenina é historicamente utilizada como elemento indutor da inflamação local em estudos que procuram avaliar a eficácia de diferentes fármacos (Meneguzzo, 2010; Li *et al.*, 2014). O composto tem sido empregado em vários modelos de experimentação animal, como promotor de dor muscular (Souza *et al.*, 2020), pleurisia (Aquino *et al.*, 2021), edema de pata (Pacheco *et al.*, 2020) e peritonite (Rodrigues *et al.*, 2015), devido sua capacidade de lesionar vasos sanguíneos, potencializar a endotoxidade, causar dor, e recrutar neutrófilos e macrófagos para a área lesionada (Morris, 2003). A peritonite induzida por carragenina é uma condição resultante da inflamação do peritônio, membrana que reveste a cavidade abdominal, e tornou-se um modelo de inflamação amplamente usado por ser facilmente reprodutível e gerar rápidos sinais cardinais de inflamação aguda (Myers; Deaver; Lewandowski, 2019).

2.4 *Listeria monocytogenes*

Listeria monocytogenes é uma bactéria Gram-positiva, intracelular facultativa, psicrófila, catalase positiva em forma de bastonete, que pode facilmente sobreviver em condições ambientais extremas de temperatura, entre -1,5 °C e 50 °C, e se desenvolver em faixas de pH entre 4 e 10 (Banerji *et al.*, 2022). Além disso, é capaz de sobreviver na presença de altas concentrações de sal (até 20% p/v) e baixa atividade de água (a_w 0,91) (Lado; Yousef, 2007). Foi descrita pela primeira vez em 1926, quando foi isolada de coelhos doentes, mas somente em 1981 a transmissão do patógeno virulento foi ligada aos alimentos (Warriner; Namvar, 2009).

Por ser capaz de sobreviver em uma ampla variedade de ambientes e causar grave infecção em indivíduos suscetíveis, a *L. monocytogenes*, tornou-se uma preocupação para a indústria alimentícia (Archer, 2018; Townsend *et al.*, 2021). Uma vez consumida, a bactéria é capaz de atravessar barreiras epiteliais, invadir células hospedeiras e se replicar intracelularmente, por meio da modulação de fatores de virulência, como internalinas e hemolisinas (Materike e Okoh., 2020). Além disso, possui um ciclo de vida complexo conferindo-lhe a capacidade de se disseminar nos tecidos ao mesmo tempo em que permanece no citosol das células hospedeiras, o que muitas vezes a resguarda da resposta imune humoral (Ireton *et al.*, 2021).

A listeriose, doença infecciosa, causada pela ingestão de alimentos contaminados pela bactéria *L. monocytogenes* possui uma taxa de mortalidade de até 30% dos casos em seres humanos (Charlier *et al.*, 2017; Materike e Okoh, 2020). E afeta, em especial, idosos, pessoas imunocomprometidas, mulheres grávidas e bebês (Lakicevic *et al.*, 2023; Byun *et al.*, 2022). A doença manifesta-se principalmente como gastroenterite, mas a bactéria é capaz de penetrar as barreiras hematoencefálicas e placentárias, podendo resultar em meningite, encefalite, abortos ou infecção neonatal generalizada (Disson; Moura; Lecuit, 2021).

Surtos de listeriose foram descritos em países como Reino Unido (McLauchin *et al.*, 2021), Alemanha (Lachmann *et al.*, 2021), Itália (Ponzio *et al.*, 2023) e Estados Unidos da América (Centros de Controle e Prevenção de Doenças, 2024). Em 2018, o maior surto de listeriose humana no mundo foi relatado na África do Sul, onde o consumo de carne processada contaminada por *L. monocytogenes* levou a 937 casos e 216 mortes (Thomas *et al.*, 2020). No Brasil a listeriose é subnotificada, o que resulta na falta de estatísticas oficiais sobre a incidência da doença (Rodrigues *et al.*, 2017).

A terapia padrão para infecções graves de listeriose é baseada em antibióticos como amoxicilina ou ampicilina, frequentemente em combinação com gentamicina (Baquero *et al.*, 2020). Entretanto alguns estudos demonstram que a *L. monocytogenes* está lentamente se tornando resistente a antibióticos pela aquisição de genes de resistência de bactérias Gram-positivas. Relatos de resistência à eritromicina, cloranfenicol, sulfametoxazol-trimetoprima, vancomicina e tetraciclina tem sido os mais comuns (Conter *et al.*, 2009; Yan *et al.*, 2019; Kayade; Okoh, 2022).

2.4.2 Modelo de infecção por *L. monocytogenes*

O uso de modelos murinos em infecções experimentais por *L. monocytogenes* tem sido empregado para investigação da resposta inflamatória durante o processo infeccioso (Murapa *et al.*, 2011, Nascimento *et al.*, 2016). Em camundongos, a listeriose provoca reações semelhantes às dos seres humanos, garantindo maior reprodutibilidade da infecção e fácil quantificação das cargas bacterianas do hospedeiro (Santana *et al.*, 2022). A administração do inóculo subletal de *L. monocytogenes* promove rápida infecção de tecidos-alvo, como fígado e baço, e uma disseminação sistêmica na corrente sanguínea, podendo ser facilmente isolada e quantificada em diferentes órgãos (Bou Ghanem *et al.*, 2012).

A maioria dos estudos que utilizam modelos experimentais de infecção por *L. monocytogenes* em murinos, realizam a inoculação bacteriana via endovenosa ou intraperitoneal (Break *et al.*, 2012; De Alcântara Almeida *et al.*, 2021). Isto ocorre a fim de garantir uma infecção sistêmica disseminada, uma vez que a administração do inóculo por via oral pode produzir variabilidade na taxa de absorção, devido as condições ácidas do estômago, e na translocação bacteriana do intestino para os demais órgãos, em razão da competição com a microbiota intestinal (Pitts; D'Orazio, 2018). Por outro lado, na inoculação via endovenosa ou intraperitoneal, há maior chance de todos os animais receberem a mesma carga bacteriana, garantindo que a simulação de infecção sistêmica seja mais facilmente otimizada (Santana *et al.*, 2022). Nesse viés, o modelo murino de infecção por *L. monocytogenes* torna-se uma atraente estratégia para investigação da eficácia de bioativos com potencial imunomodulador.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

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

3.2 Objetivos específicos

a) Avaliar a influência da ConBr sobre o perfil e quantidade de leucócitos no fluido peritoneal e sangue de camundongos *Swiss* estimulados com carragenina;

- b) Determinar a influência da ConBr na expressão gênica das citocinas IL- 1 β , IL-10 e TNF- α no baço de camundongos *Swiss* estimulados com carragenina;
- c) Analisar a viabilidade celular de macrófagos peritoneais infectados por *Listeria monocytogenes* em resposta aos tratamentos com ConBr;
- d) Avaliar a influência da ConBr sobre o perfil e quantidade de leucócitos no fluido peritoneal e sangue de camundongos *Swiss* infectados por *L. monocytogenes*;
- e) Avaliar a influência da ConBr sobre a eliminação de bactérias no sangue, fluido peritoneal, no baço e fígado de camundongos *Swiss* infectados por *L. monocytogenes*;

4. MATERIAIS E MÉTODOS

O projeto foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal Rural de Pernambuco (CEUA nº 5315260821). Todos os ensaios foram realizados no Laboratório de Microbiologia e Imunologia da UFRPE.

4.1 Materiais

A lectina de *Canavalia brasiliensis* (ConBr) foi obtida pela Dra. Ayrles Fernanda Silva, a partir de sementes da planta, sob supervisão do Prof. Dr. Márcio Viana Ramos, do Laboratório de Bioquímica Vegetal da Universidade Federal do Ceará (UFC) (Sisgen - AE9053B). A lectina foi purificada e isolada através de cromatografia de afinidade em coluna com matriz de Sephadex G-50, conforme Moreira e Cavada (1984). A carragenina comercial foi adquirida da empresa Sigma - Aldrich Brasil LTDA (C1013-25G).

4.2 Animais

Os Camundongos, N^o= (40), foram obtidos através do Biotério do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA) da Universidade Federal de Pernambuco. Todos os animais eram fêmeas de camundongos linhagem *Swiss* adultos (3 - 4 semanas de idade) com peso entre 30g - 40g, que foram mantidos em gaiolas com livre demanda de água e ração em biotério com controle de luminosidade 12h claro/escuro e temperatura entre 22^o - 24^o C e livres de situação patogênica até o momento do experimentos.

4.3 Microrganismo

A cepa patogênica de *Listeria monocytogenes* (L619), isolada de caso clínico humano, e pertencente ao acervo de bactérias do Instituto Ageu Magalhães (FIOCRUZ, Recife - PE), foi cedida pela Dra. Nilma Cintra (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 enriquecido seletivo para *Listeria*. As culturas foram ajustadas em espectrofotômetro a 630 nm, considerando a densidade óptica de 0.5 correspondente a 10^8 células/mL. Em seguida, foram realizadas diluições seriadas para ajustar a concentração em 10^3 células/ mL, usada nos experimentos.

4.4 Inflamação experimental *in vivo* com carragenina

Para indução da peritonite, camundongos *Swiss* (n=4/grupo) foram administrados, via intraperitoneal, com carragenina (0,2 mL; 0,5 mg/animal). Após 30 minutos, os animais foram submetidos a injeções contendo ConBr (1 e 10 mg/kg), via endovenosa, através da veia da cauda. Camundongos saudáveis, submetidos a inflamação e administrados com PBS (Tampão fosfato-salino) ou com dexametasona (0,5 mg/kg) foram utilizados como controles, conforme descrito a seguir:

Grupo I (controle): Saudável

Grupo II (controle): Carragenina + PBS

Grupo III (controle): Carragenina + Dexa (0,5 mg/kg)

Grupo IV (experimental): Carragenina + ConBr (1 mg/kg)

Grupo V (experimental): Carragenina + ConBr (10 mg/kg)

Após 6h da administração dos tratamentos, foram retiradas alíquotas de sangue via plexo retro-orbital para contagem total e diferencial de leucócitos. Posteriormente, foram realizadas as eutanásias por meio da inalação excessiva do anestésico inalatório Isoflurano. Atestada a morte, o ventre dos animais foi limpo com álcool 70% e dissecado de forma asséptica para a exposição do peritônio. A seguir, foi injetado na cavidade peritoneal 10 ml de PBS estéril. Alíquotas de fluido peritoneal foram retiradas com auxílio de pipeta estéril, para quantificação de leucócitos totais e diferenciais. Logo após, o baço foi retirado para extração de RNA e análise da expressão gênica de mediadores inflamatórios.

4.5 Infecção experimental *in vivo* com *Listeria monocytogenes*

Para infecção dos animais (n=4/grupo), foi inoculada uma suspensão de *L. monocytogenes*, por via intraperitoneal (0,2 mL; 1×10^3 UFC/mL). Após 30 minutos da administração do inóculo bacteriano, os animais foram tratados com ConBr (1 e 10 mg/kg) ou administrados com dexametasona (0,5mg/kg), gentamicina (10mg/kg) ou PBS, via endovenosa. Os grupos foram divididos conforme descrito a seguir:

GRUPO I (controle): *Listeria* + PBS

GRUPO II (controle): *Listeria* + Dexa (0,5 mg/ Kg)

GRUPO III (controle): *Listeria* + Gen (10 mg/Kg)

GRUPO IV (experimental): *Listeria* + ConBr (1 mg/kg)

GRUPO V (experimental): *Listeria* + ConBr (10mg/kg)

Depois de 6h de tratamento, o sangue foi retirado via plexo retro-orbital para contagem total e diferencial de leucócitos e quantificação de unidades formadoras de colônias (UFC). Em seguida, foi realizada a eutanásia por meio da inalação excessiva do anestésico inalatório Isoflurano. Após a morte, o ventre dos animais foi limpo e foi injetado na cavidade peritoneal 10 ml de PBS estéril. Alíquotas de fluido peritoneal foram retiradas para quantificação de leucócitos totais e diferenciais, análise da viabilidade dos macrófagos e contagem de UFC. Seguidamente, o fígado e o baço foram retirados para quantificação de bactérias.

4.6 Viabilidade de macrófagos infectados

Macrófagos peritoneais (pMØ) de animais infectados com *L. monocytogenes* e tratados com ConBr (10 e 1 mg/kg) e grupos controles administrados com dexametasona, gentamicina ou administrados com PBS, foram submetidos a análise de viabilidade celular. Alíquotas do fluido peritoneal contendo os macrófagos foram retirados de cada animal e adicionadas a placa de poliestireno 96 poços, e logo após, a placa foi incubada a 5% de CO₂/37°C por 24h para fixação das células na placa. No dia seguinte, foi adicionado 20µl de resazurina (0,15 mg/ml em PBS estéril) aos poços por 4h, seguido de leituras em espectrofotômetro a 570 e 600 nm. A viabilidade celular foi expressa em porcentagem em relação aos macrófagos peritoneais não tratados de animais infectados.

4.7 Quantificação bacteriana

Para quantificação de unidades formadoras de colônias (UFC), baço e fígado foram macerados em PBS e em seguida, foram submetidos a diluições seriadas (10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3}). A seguir, uma alíquota de cada diluição foi semeada em placas de Petri com Ágar Mueller Hinton. Amostras de fluido peritoneal e sangue também foram diluídas e quantificadas. Todas as placas foram incubadas em estufa por 24 horas a 37°C , e após esse período, as colônias foram quantificadas.

4.8 Contagem total e diferencial de leucócitos

Para contagem total de leucócitos, $20\mu\text{L}$ de sangue (coletado via plexo retro-orbital) e $20\mu\text{L}$ de fluido peritoneal foram corados com $180\mu\text{L}$ de reagente Turk e as células totais quantificadas em câmara de Neubauer, com o auxílio de um microscópio óptico. Para contagem diferencial de leucócitos, foram utilizados $10\mu\text{L}$ de fluido peritoneal e de sangue para realização do esfregaço na lâmina, e posteriormente, as lâminas foram coradas com kit panótico rápido. Logo após, neutrófilos, linfócitos, monócitos e eosinófilos foram contados em microscópio óptico e os resultados expressos em média \pm erro padrão médio $\times 10^3$ de células/ mm^3 .

4.9 Expressão gênica de mediadores inflamatórios

O RNA total do baço de animais inflamados com carragenina, foi extraído de acordo com Nascimento *et al.*, (2016). A pureza do RNA foi confirmada em espectrofotômetro NanoDrop One (Thermo Scientific). O RNA foi empregado como molde para síntese de DNA complementar (cDNA) por meio de transcrição reversa, utilizando o Primer p(dT)15 para síntese de cDNA (Roche Diagnostic, ref 10814270001). A integridade do cDNA foi confirmada por eletroforese em gel de agarose 1,5% (70 V, 120 A por 35 minutos) corado com corante blue-green (LGC Biotechnology). Para amplificação por RT-qPCR Tempo Real, foi utilizado o kit comercial (SIGMA-SYBR-Green Quantitative RT-qPCR KIT) e primers específicos para amplificação das citocinas Interleucina 1 beta (IL-1 β), Interleucina 10 (IL-10) e Fator de Necrose Tumoral Alfa (TNF- α). No preparo da reação foram adicionadas as seguintes quantidades: $2,0\mu\text{L}$ de cDNA, $2,0\mu\text{L}$ de MgCl_2 , $9,0\mu\text{L}$ de SYBR-Green, $0,4\mu\text{L}$ (100 μM) de cada primer e $6,2\mu\text{L}$ de água ultrapura para um volume final de $20\mu\text{L}$. O controle interno de amplificação foi realizado utilizando primers para amplificação

da proteína Ubiquitina C (UBC), conforme Tavares *et al.*, (2023). As reações de RT-qPCR foram realizadas com as seguintes condições: 40 ciclos de 95°C/15 segundos, 60°C/60 segundos (Rotor Gene Q series - Qiagen). As sequências de primers utilizadas estão descritas na Tabela 1.

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

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

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

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

Nome do gene	Sequência de primers
TNF- α	(F) ATTATGGCTCAGGGTCCAAC (R) AAAGCCATTTGAGTCCTTG
IL-1 β	(F) TGAGCACCTTCTTTTCCTTCA (R) TTGTCTAATGGGAACGTCACAC
IL-10	(F) CATGGGTCTTGGGAAGAGAA (R) AACTGGCCACAGTTTTTCAGG
UBC (controle interno)	(F) CCCAGTGTTACCACCAAGAAG (R) CCCCATCACACCCAAGAACA

4.10 Análise estatística

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média. As diferenças estatísticas entre os grupos foram obtidas por análises de variância (ANOVA) seguidas pelo teste de Bonferroni com intervalo de confiança de $P < 0,05$. Para análises e elaboração dos gráficos foi utilizado o programa *Graphpad Prism* versão 8.0.1.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O estudo de lectinas vegetais tem avançado consideravelmente nas últimas décadas, sobretudo para fins farmacológicos (Assreuy *et al.*, 1997; Reis *et al.*, 2008; Patriota *et al.*, 2022). A lectina de *Canavalia brasiliensis* (ConBr) tem sido analisada frente a diversos modelos experimentais que procuram avaliar suas propriedades terapêuticas, como ação cicatrizante (Silva *et al.*, 2009), efeito antinociceptivo (Pires *et al.*, 2013), antitumoral (Silva *et al.*, 2014) e antiviral (Gondim *et al.*, 2019). Nesse contexto, a ConBr tem se destacado como um adjuvante imune capaz de modular a resposta inflamatória em favor do hospedeiro (Batista *et al.*, 2017), e por isso, tornou-se alvo de investigação do presente trabalho.

Inicialmente, avaliamos se em um modelo de inflamação experimental, a administração endovenosa da ConBr poderia influenciar a regulação do processo inflamatório. Para tanto, camundongos Swiss foram administrados com carragenina, via intraperitoneal, com o objetivo de induzir a peritonite. Na fase de tratamento, foi utilizado ConBr 1 e 10 mg/kg, conforme estudos anteriores que evidenciam a efetividade e atoxicidade da lectina nessas concentrações (Pinto *et al.*, 2013; Barbosa, 2013; Oliveira *et al.*, 2022). Além disso, adicionamos grupos controles contendo animais sem tratamento ou administrados com dexametasona, um glicocorticoide anti-inflamatório que serviu de parâmetro para comparar a atividade imunomoduladora da ConBr no recrutamento de leucócitos para a cavidade intraperitoneal.

A inflamação é considerada um processo essencial para ativação da resposta do hospedeiro ao dano celular causado por microrganismos patogênicos, agentes físicos, químicos e reações imunológicas (Wallach; Kang; Kovalenko, 2014). Assim, a reação inflamatória aguda é caracterizada pela vasodilatação, exsudação de fluidos e migração de leucócitos, especialmente neutrófilos, que são atraídos para o local da inflamação através de quimiotaxia, movendo-se em direção aos gradientes químicos formados pelos mediadores inflamatórios (Sherwood; Toliver-Kinsky, 2004).

Com o intuito de avaliar a influência da ConBr no recrutamento leucocitário durante o pico da resposta inflamatória, foram realizadas quantificações de leucócitos totais e diferenciais em esfregaços de fluído peritoneal e sangue periférico dos animais submetidos a inflamação experimental com carragenina e posteriormente tratados com ConBr após 6 horas.

No fluido peritoneal não foram observadas diferenças estatísticas que indicassem aumento ou redução da contagem de leucócitos totais nos animais tratados com ConBr (1 e 10 mg/kg), em relação aos demais grupos. No entanto, na contagem diferencial de leucócitos, observou-se que, quando comparado aos outros grupos, ConBr nas concentrações de 1 e 10 mg/kg aumentou a migração de neutrófilos para cavidade peritoneal (Tabela 2-A).

A quantificação total de leucócitos no sangue periférico apontou que a ConBr (1 e 10 mg/kg) promoveu aumento da circulação de leucócitos no sangue após 6 horas do tratamento. A contagem diferencial de leucócitos no sangue mostrou que os animais tratados com ConBr 10 mg/kg também apresentaram maior quantidade de neutrófilos quando comparado ao grupo de animais administrados com PBS ou administrados com dexametasona ($P < 0,05$). Por outro lado, animais tratados com ConBr 1 mg/kg apresentaram diferença no quantitativo de linfócitos apenas quando comparados ao grupo dexametasona (Tabela 2-B).

Anteriormente, Rodriguez *et al.*, (1992) e Bento *et al.*, (1993) relataram o aumento de leucócitos em camundongos saudáveis administrados com ConBr. Enquanto Silva *et al.*, (2016) demonstraram uma infiltração leucocitária significativa para a cavidade peritoneal e sangue de camundongos que receberam pré-tratamentos com ConBr, em um modelo de infecção experimental por *Salmonella* Typhimurium. Este estímulo à migração de células imunes para o sítio inflamado/infectado, em especial neutrófilos e células mononucleares, é importante para o início da resposta a lesão tecidual através da ativação de mais células imunes por quimiotaxia (Silva; Carvalho; Roque-Barreira, 2012).

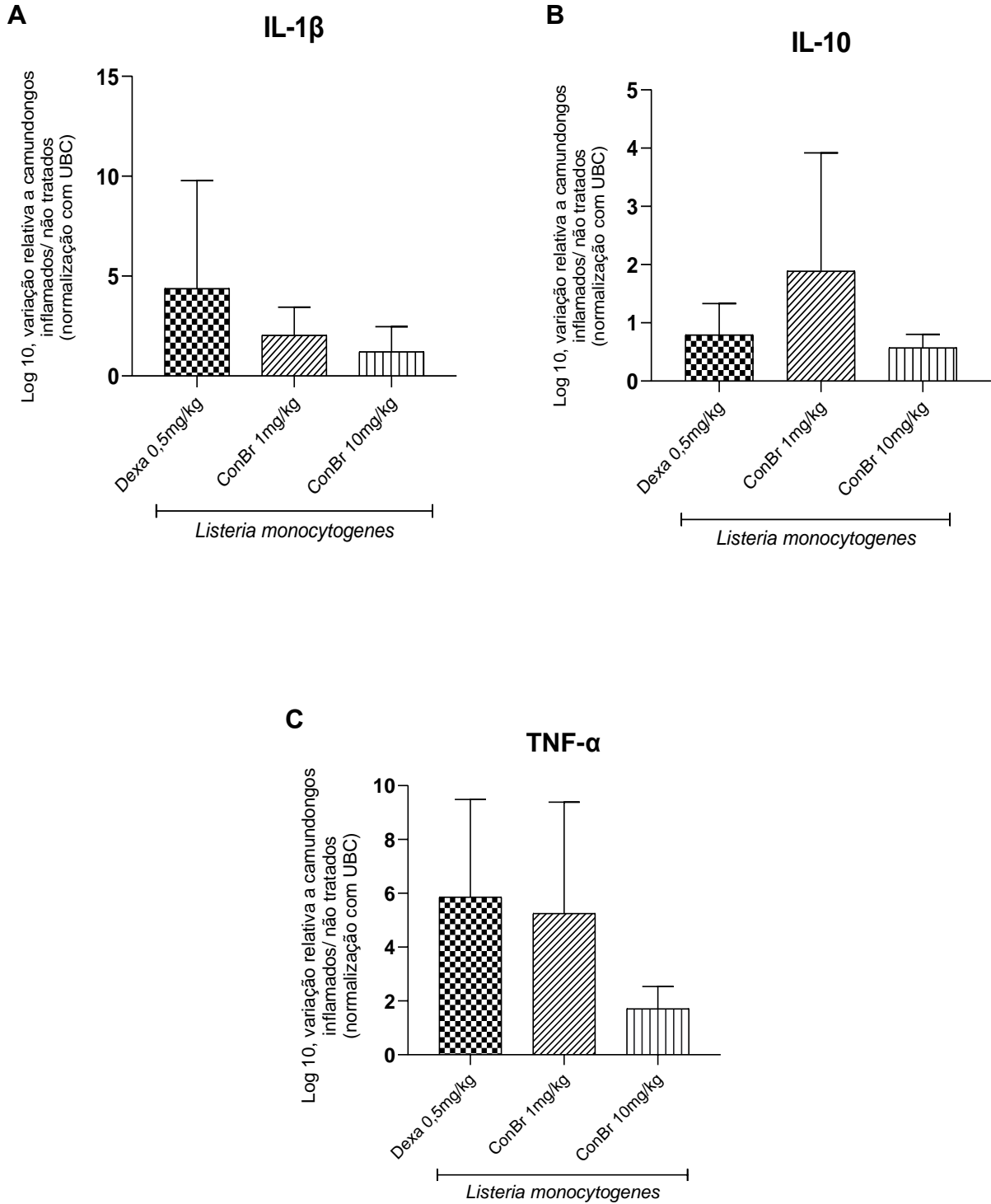
Os neutrófilos são as primeiras células que migram para local da inflamação por sua capacidade de migrar, fagocitar e produzir produtos reativos de oxigênio (Coelho *et al.*, 2006). A ação das lectinas sobre a modulação da resposta inflamatória mediada por neutrófilos, ocorre através da interação direta com a célula imune ou por um mecanismo indireto que envolve mediadores inflamatórios e outros quimioatrativos liberados por células residentes e infiltrantes (Figueiredo *et al.*, 2009). O recrutamento de neutrófilos induzida pela ConBr ocorre por via indireta, mediante aumento na expressão de citocinas inflamatórias (Silva *et al.*, 2016), embora esse aumento também seja associado a maior liberação de óxido nítrico (NO) (Andrade *et al.*, 1999; Silva *et al.*, 2011).

TABELA 2- Contagem total e diferencial de leucócitos em camundongos *Swiss* após 6 horas de tratamento contra peritonite induzida por carragenina.

A- Quantificação de leucócitos no fluido peritoneal ($10^3/\text{mm}^3$)						
Grupos	Leucócitos totais ($10^3/\text{mm}^3$)	Contagem diferencial de leucócitos				
		Neutrófilos	Linfócitos	Monócitos	Eosinófilos	
Saudável	1,11 ± 0,28	0,03 ± 0,016	0,85 ± 0,29	0,22 ± 0,11	0,00 ± 0,00	
Carragenina	PBS	1,72 ± 0,78	0,01 ± 0,02	0,79 ± 0,35	0,60 ± 0,56	0,00 ± 0,00
	Dexa_(0,5mg/kg)	0,70 ± 0,27 [#]	0,00 ± 0,00	0,66 ± 0,29	0,03 ± 0,02	0,00 ± 0,00
	ConBr_(1mg/kg)	1,36 ± 0,18	0,24 ± 0,05 ^{**#} δ	0,24 ± 0,07 [*]	0,87 ± 0,15 [*] δ	0,00 ± 0,00
	ConBr_(10mg/kg)	1,08 ± 0,24	0,25 ± 0,13 ^{**#} δ	0,20 ± 0,12 ^{**#}	0,62 ± 0,10	0,00 ± 0,00
B- Quantificação de leucócitos no sangue ($10^3/\text{mm}^3$)						
Grupos	Leucócitos totais ($10^3/\text{mm}^3$)	Contagem diferencial de leucócitos				
		Neutrófilos	Linfócitos	Monócitos	Eosinófilos	
Saudável	2,63 ± 0,76	0,36 ± 0,29	1,67 ± 0,17	0,60 ± 0,33	0,00 ± 0,00	
Carragenina	PBS	3,67 ± 1,84	0,05 ± 0,08	2,77 ± 2,57	0,08 ± 0,08 [*]	0,00 ± 0,00
	Dexa_(0,5mg/kg)	1,28 ± 0,59	0,00 ± 0,00	1,05 ± 0,52	0,23 ± 0,22	0,00 ± 0,00
	ConBr_(1mg/kg)	5,16 ± 0,89 [*] δ	0,70 ± 0,30	4,12 ± 0,95 ^{\delta}	0,33 ± 0,06	0,00 ± 0,00
	ConBr_(10mg/kg)	4,90 ± 0,47 ^{\delta}	0,92 ± 0,65 [#] δ	3,53 ± 0,28	0,33 ± 0,20	0,00 ± 0,00

* p < 0,05 indica diferença estatística comparada ao grupo saudável; # p < 0,05 indica diferença estatística comparada ao grupo carragenina + PBS; δ p < 0,05 indica diferença estatística comparada ao grupo dexametasona. (ANOVA one-way, seguido do teste de Bonferroni).

FIGURA 2- Expressão gênica dos mediadores inflamatórios IL-1 β (A), IL-10 (B) e TNF- α (C) em animais inflamados com carragenina e tratados com ConBr após 6 horas.

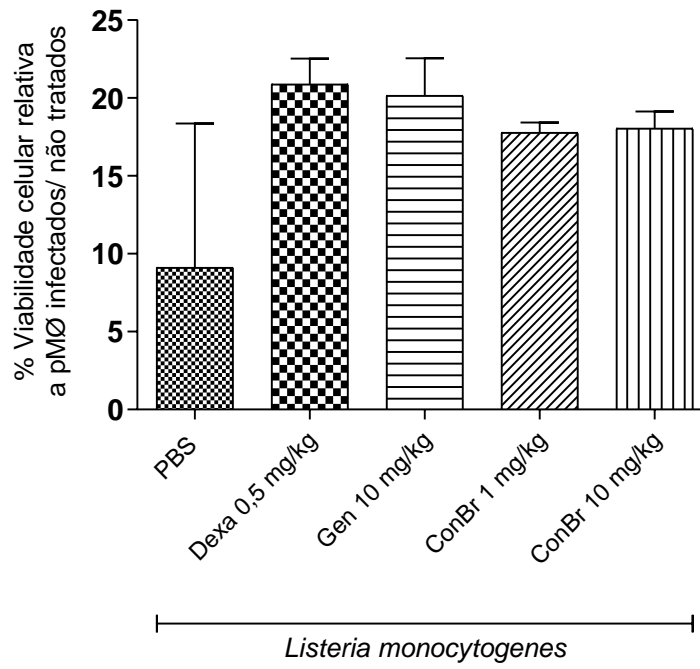


Para determinar quais possíveis mediadores inflamatórios poderiam ter sido acionados com os tratamentos com ConBr no modelo experimental da peritonite induzida por carragenina, foi avaliada a expressão gênica de citocinas pró- e anti-inflamatórias. Nossos resultados demonstram que a ConBr modulou a expressão gênica das citocinas IL-1 β , IL-10 e TNF- α , contudo de forma semelhante aos níveis basais induzidos no grupo inflamado administrado com dexametasona (Figura 2). Em estudos anteriores a ConBr foi capaz de induzir *in vitro* a proliferação linfocitária com produção de IFN- γ , IL-4, IL-10 e TNF- α (Cavada *et al.*, 2001) e a produção de transcritos de RNAm para IL-6, TNF- α e IL-12 (Batista *et al.*, 2017).

Com base nos resultados iniciais, prosseguimos para avaliação da ConBr diante da infecção por *Listeria monocytogenes*. Nesse modelo de listeriose experimental os animais foram inoculados com doses subletais da bactéria via intraperitoneal, e em seguida, tratados com ConBr via endovenosa. Após 6 horas, a os animais foram avaliados para verificar qual o efeito dos tratamentos com a lectina na disseminação sistêmica da bactéria. Para isso, além de um grupo controle tratado com dexametasona, foi incluído um grupo tratado com gentamicina, um antibiótico frequentemente utilizado para tratar listeriose.

Sabe-se que os macrófagos são importantes efetores celulares envolvidos na apresentação de antígenos e na atividade bactericida, sendo capazes de expressar moléculas efetoras citotóxicas como peroxidase, protease citolítica, óxido nítrico (NO) e citocinas pró-inflamatórias (Keshewani; Sodhi, 2007). Com o propósito de analisar a influência da ConBr sobre a viabilidade de macrófagos peritoneais (pM \emptyset) nos animais infectados por *L. monocytogenes* e tratados com a lectina, foi realizado um teste de viabilidade celular. Nesse sentido, após 6h de tratamento com ConBr (1 e 10 mg/kg), não houve diferenças estatísticas que sugerissem aumento na viabilidade celular dos grupos tratados com a lectina, quando comparados ao grupo PBS (infectado/não tratado) (Figura 3).

FIGURA 3 - Viabilidade celular de pMØ de camundongos *Swiss* tratados com ConBr (1 e 10 mg/kg) após a infecção por *L. monocytogenes*.



Com a finalidade de verificar a influência da ConBr no recrutamento de leucócitos durante a infecção por *L. monocytogenes*, foram realizadas quantificações de leucócitos totais e diferenciais em esfregaços de fluido peritoneal e sangue periférico dos animais infectados e tratados com ConBr, após 6 horas.

Conforme é possível observar na Tabela 3- A, não houve diferenças estatísticas na quantificação total e diferencial de leucócitos presentes no fluido peritoneal entre todos os grupos. Com relação a contagem total de células no sangue periférico não houve diferença estatística entre os grupos tratados com a lectina e o grupo infectado/não tratado (PBS). Entretanto, a análise estatística apontou diferença significativa entre os animais tratados com ConBr 10 mg/kg e os animais tratados com dexametasona, evidenciando apenas o efeito imunossupressor do glicocorticoide (Tabela 3-B).

Em um estudo utilizando ConBr (0,1, 1 e 10 mg/kg) via endovenosa para tratar pancreatite induzida, Oliveira *et al.*, (2022) observaram a redução da infiltração neutrofílica pancreática, em camundongos tratados com a lectina. Neste trabalho, a contagem diferencial de leucócitos no sangue periférico de animais infectados por *L. monocytogenes* e posteriormente tratados com ConBr, evidenciou apenas um menor número de neutrófilos nos animais tratados com gentamicina, quando comparado com animais administrados com PBS (Tabela 3-B). A partir disso, é possível considerar que a ConBr não influenciou o recrutamento de leucócitos para o peritônio ou sangue de animais infectados por *L. monocytogenes* após 6 horas de tratamento.

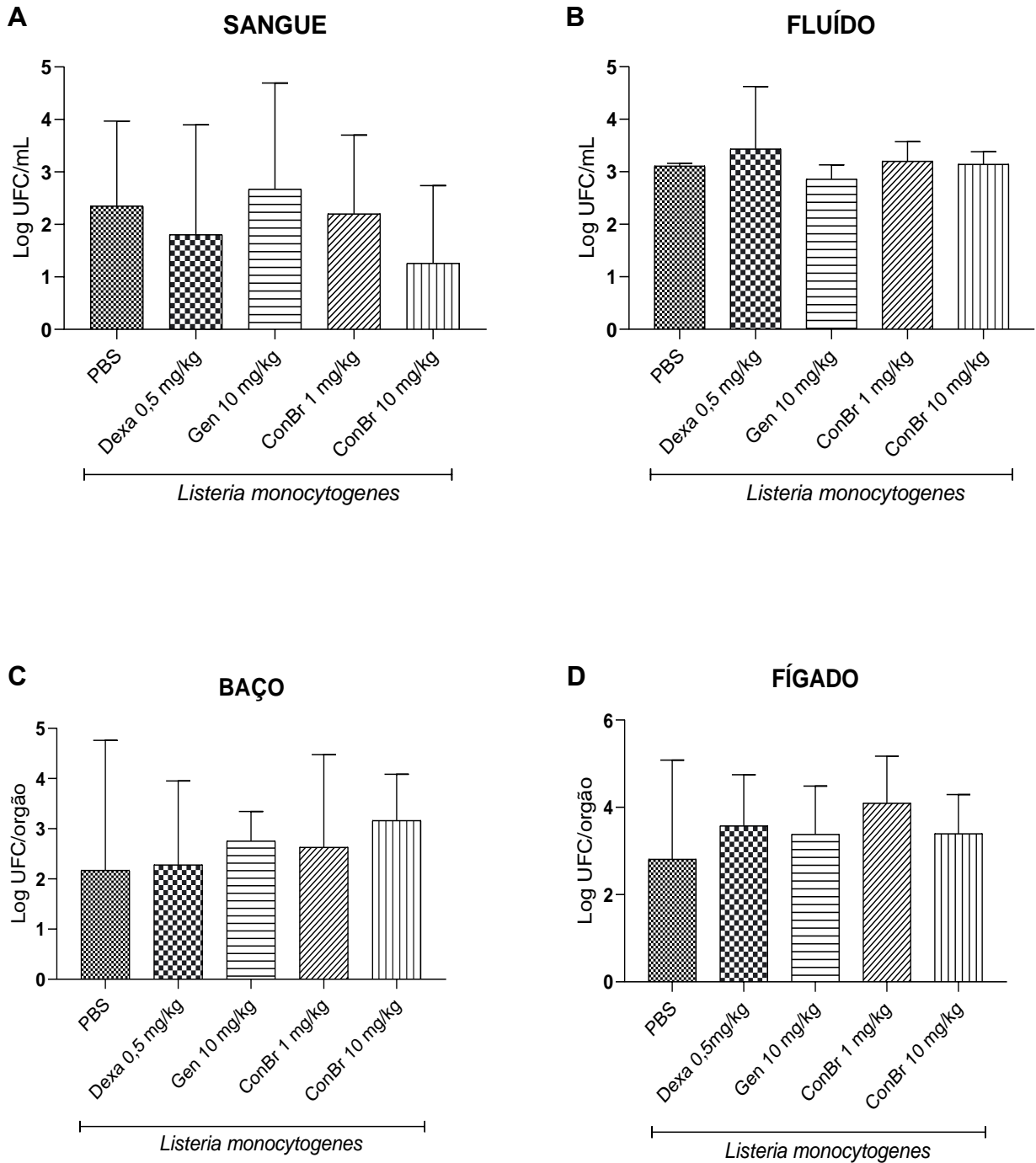
No decorrer da infecção, *L. monocytogenes* possui a capacidade de transitar do epitélio intestinal para a corrente sanguínea e se disseminar para órgãos alvo, como fígado e baço (Cossart; Toledo-Arana, 2011). Dessa forma, o sangue periférico, fluido peritoneal, baço e fígado de camundongos *Swiss* infectados por *L. monocytogenes* foram avaliados quanto a carga bacteriana após 6 horas da aplicação endovenosa de ConBr. As análises das quantificações bacterianas demonstraram que os grupos tratados ConBr (1 e 10 mg/kg) não apresentaram diferença significativa, quando comparado aos grupos controles em nenhum dos órgãos ou fluidos testados (Figura 4).

TABELA 3 - Contagem total e diferencial de leucócitos em camundongos *Swiss* após 6 horas de tratamento contra infecção por *Listeria monocytogenes*.

A- Quantificação de leucócitos no fluido peritoneal ($10^3/\text{mm}^3$)						
	Grupos	Leucócitos totais ($10^3/\text{mm}^3$)	Contagem diferencial de leucócitos			
			Neutrófilos	Linfócitos	Monócitos	Eosinófilos
<i>Listeria monocytogenes</i>	PBS	1,02 ± 0,18	0,11 ± 0,09	0,54 ± 0,36	0,18 ± 0,16	0,00 ± 0,00
	Dexa (0,5mg/kg)	0,80 ± 0,08	0,07 ± 0,01	0,67 ± 0,07	0,05 ± 0,01	0,00 ± 0,00
	Gen (10mg/kg)	0,72 ± 0,11	0,05 ± 0,02	0,59 ± 0,12	0,07 ± 0,00	0,00 ± 0,00
	ConBr (1mg/kg)	1,06 ± 0,22	0,04 ± 0,02	0,79 ± 0,21	0,22 ± 0,15	0,00 ± 0,00
	ConBr (10mg/kg)	0,72 ± 0,25	0,07 ± 0,03	0,54 ± 0,19	0,09 ± 0,04	0,00 ± 0,00
B- Quantificação de leucócitos no sangue ($10^3/\text{mm}^3$)						
	Grupos	Leucócitos totais ($10^3/\text{mm}^3$)	Contagem diferencial de leucócitos			
			Neutrófilos	Linfócitos	Monócitos	Eosinófilos
<i>Listeria monocytogenes</i>	PBS	2,6 ± 1,31	0,37 ± 0,15	2,12 ± 1,16	0,15 ± 0,12	0,00 ± 0,00
	Dexa (0,5 mg/kg)	1,51 ± 0,33	0,15 ± 0,05	1,23 ± 0,30	0,12 ± 0,03	0,00 ± 0,00
	Gen (10 mg/kg)	3,43 ± 0,89	0,07 ± 0,14*	0,92 ± 1,84	0,02 ± 0,04	0,00 ± 0,00
	ConBr (1mg/kg)	3,33 ± 0,86	0,21 ± 0,09	2,25 ± 0,97	0,11 ± 0,10	0,00 ± 0,00
	ConBr (10mg/kg)	3,72 ± 0,54 [#]	0,29 ± 0,05	3,29 ± 0,56	0,13 ± 0,07	0,00 ± 0,00

* p < 0,05 indica diferença estatística comparada ao grupo PBS; # p < 0,05 indica diferença estatística comparada ao grupo dexametasona; (ANOVA one-way, seguido do teste de Bonferroni).

FIGURA 4. Quantificação de UFC de *L. monocytogenes* após tratamento de 6 horas com ConBr (1 e 10mg/kg) no sangue (A), fluido peritoneal (B), baço (C) e fígado (D) de camundongos Swiss.



6. CONCLUSÃO

Embora os resultados obtidos nos testes com o modelo de inflamação experimental utilizando carragenina indicassem um potencial imunomodulador da lectina ConBr, através do aumento da infiltração leucocitária no local da inflamação, não foi possível verificar esse mesmo efeito nos testes realizados com o modelo de infecção por *Listeria monocytogenes*. A administração endovenosa de ConBr (1 e 10 mg/kg) não foi capaz de influenciar a contagem de leucócitos totais e diferenciais no fluido peritoneal e sangue de animais infectados, nem aumentou a viabilidade celular dos macrófagos peritoneais. Além disso, não reduziu a contagem bacteriana no sangue, fluido peritoneal, baço e fígado. Portanto, considerando as concentrações, tempo de tratamento e vias de administração testadas, a ConBr não exerceu ação imunomoduladora que fosse benéfica ao controle da listeriose experimental.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARCHER, D. L. The evolution of FDA's policy on *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods in the United States. *Current Opinion in Food Science*, v. 20, p. 64–68, 1 abr. 2018. Acesso em: 20 jan. 2023.

ANDRADE, J. L. *et al.* Lectin-Induced Nitric Oxide Production. ***Cellular Immunology***, 25 maio. 1999. v. 194, n. 1, p. 98–102. Acesso em: 11 fev. 2024.

ALON, R.; SHULMAN, Z. Chemokine triggered integrin activation and actin remodeling events guiding lymphocyte migration across vascular barriers. ***Experimental Cell Research***, 10 mar. 2011. v. 317, n. 5, p. 632–641. Acesso em: 3 fev. 2024.

AQUINO, D. F. S. *et al.* Cicatrização de feridas e efeitos anti-inflamatórios do extrato aquoso de *Alibertia edulis* em camundongos. ***Perspectivas Experimentais e Clínicas, Inovações Biomédicas e Educação em Saúde (PECIBES)***, 24 dez. 2021. v. 7, n. 2, p. 15–19. Disponível em: <https://periodicos.ufms.br/index.php/pecibes/article/view/14832>. Acesso em: 6 set. 2023.

ASSREUY, A. M. S. *et al.* Anti-inflammatory effect of glucose—mannose binding lectins isolated from Brazilian beans. ***Mediators of Inflammation***, 1997. v. 6, n. 3, p. 201–210. Disponível em: <https://www.hindawi.com/journals/mi/1997/321392/>. Acesso em: 3 fev. 2024.

ARAÚJO, L. C. C. *et al.* Evaluation of cytotoxic and anti-inflammatory activities of extracts and lectins from *Moringa oleifera* seeds. ***PloS one***, 9 dez. 2013. v. 8, n. 12. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24349164/>. Acesso em: 3 fev. 2024.

BAHARI, A. *et al.* Understanding the effect of time, temperature and salts on carrageenan extraction from *Chondrus crispus*. ***Algal Research***, 1 out. 2021. v. 58, p. 102371. Acesso em: 1º fev. 2024.

BAQUERO, F. *et al.* Ecogenetics of antibiotic resistance in *Listeria monocytogenes*. ***Molecular Microbiology***, v. 113, n. 3, p. 570–579, 1 mar. 2020. Acesso em: 20 jan. 2023.

BANERJI, R. *et al.* Bacterial communication in the regulation of stress response in *Listeria monocytogenes*. ***LWT***, 15 jan. 2022. v. 154, p. 112703. Acesso em: 20 fev. 2023.

BARBOZA, B. R. *et al.* Potencial imunomodulatório da lectina de inflorescências de *Alpinia purpurata* (ApuL) frente a neutrófilos humanos. *In: ANAIS DO 5º ENCONTRO BRASILEIRO PARA INOVAÇÃO TERAPÊUTICA*, 2017, Recife. **Anais eletrônicos**. Campinas, Galoá, 2017. Disponível em: <https://proceedings.science/ebit/ebit-2017/trabalhos/potencial-imunomoduladorio-da-lectina-de-inflorescencias-de-alpinia-purpurata-ap?lang=pt-br>. Acesso em: 28 jan. 2024.

BARBOSA, P. P. S. **Purificação, caracterização e atividade biológica de lectinas do extrato de sementes de *Canavalia brasiliensis* (feijão-bravo-do-Ceará)**. 2013.

74 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2013. Acesso em: 25 jan. 2024.

BATISTA, J. E. C. *et al.* Plant lectins ConBr and CFL modulate expression toll-like receptors, pro-inflammatory cytokines and reduce the bacterial burden in macrophages infected with *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. **Phytomedicine**, 15 fev. 2017. v. 25, p. 52–60. Acesso em: 11 ago. 2023.

BENTO, C. A. M. *et al.* Rat paw edema and leukocyte immigration induced by plant lectins. **Agents and actions**, jan. 1993. v. 38, n. 1–2, p. 48–54. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8480538/>>. Acesso em: 26 jan. 2024.

BEZERRA, E. H. S. *et al.* Structural analysis of ConBr reveals molecular correlation between the carbohydrate recognition domain and endothelial NO synthase activation. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 20 maio. 2011. v. 408, n. 4, p. 566–570. Acesso em: 8 dez. 2023.

BOU GHANEM, E. N. *et al.* InIA Promotes Dissemination of *Listeria monocytogenes* to the Mesenteric Lymph Nodes during Food Borne Infection of Mice. **PLoS Pathogens**, nov. 2012. v. 8, n. 11, p. 1003015. Disponível em: </pmc/articles/PMC3499570/>. Acesso em: 3 fev. 2024.

BRASIL. Ministério da Saúde- Agência Nacional de Vigilância Sanitária- Anvisa. **Farmacopeia Brasileira**, 6ª Edição. Volume II- Monografias. Insumos Farmacêuticos e Especialidades. Carragenina IF082-00. Brasília, DF, 2019. Disponível em: <<http://bibliotecadigital.anvisa.ibict.br/jspui/handle/anvisa/982>>. Acesso em: 6 set. 2023.

BREAK, T. J. *et al.* Extracellular Superoxide Dismutase Inhibits Innate Immune Responses and Clearance of an Intracellular Bacterial Infection. **The Journal of Immunology**, 1 abr. 2012. v. 188, n. 7, p. 3342–3350. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.1102341>>. Acesso em: 3 fev. 2024.

BREITENBACH BARROSO COELHO, L. C. *et al.* Lectins as antimicrobial agents. **Journal of Applied Microbiology**, 1 nov. 2018. v. 125, n. 5, p. 1238–1252. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/jam.14055>>. Acesso em: 5 set. 2023.

BYUN, K. H. *et al.* Isolation, characterization, and application of bacteriophages to reduce and inhibit *Listeria monocytogenes* in celery and enoki mushroom. **Food Control**, 1 maio. 2022. v. 135, p. 108826. Acesso em: 20 fev. 2023.

CARNEIRO, M. A. M. S. *et al.* Immunomodulatory and anti-infective effects of *Cratylia mollis* lectin (Cramoll) in a model of wound infection induced by *Staphylococcus aureus*. **International Immunopharmacology**, 1 nov. 2021. v. 100, p. 108094. . Acesso em: 31 jan. 2024.

CAMPOS, J. K. L. *et al.* Anti-inflammatory and antinociceptive activities of *Bauhinia monandra* leaf lectin. **Biochimie Open**, 1 jun. 2016. v. 2, p. 62–68. Acesso em: 28 jan. 2024.

CAVADA, B.S. *et al.* Revisiting proteus: Do Minor Changes in Lectin Structure Matter in Biological Activity? Lessons from and Potential Biotechnological Uses of the Diocleinae Subtribe Lectins. **Current Protein & Peptide Science**, 25 mar. 2001. v. 2, n. 2, p. 123–135. Acesso em: 13 fev. 2024.

CAVADA, B. S. *et al.* One century of ConA and 40 years of ConBr research: A structural review. **International Journal of Biological Macromolecules**, 2019. v. 134, p. 901–911. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141813019321361> .

CAVADA, B. S. *et al.* Comprehensive review on Caelsalpinioideae lectins: From purification to biological activities. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 162, p. 333–348, 1 nov. 2020. Acesso em: 11 ago. 2023.

CENTROS DE CONTROLE E PREVENÇÃO DE DOENÇAS, Listeria Outbreaks, 2024. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/index.html>>. Acesso em: 6 mar. 2024.

COELHO, M. B. *et al.* Neutrophil migration in mice induced by a mannose-binding lectin isolated from *Annona coriacea* seeds. **Toxicon**, 1 out. 2006. v. 48, n. 5, p. 529–535. Acesso em: 11 fev. 2024.

COELHO, L. C. B. B. *et al.* Lectins, Interconnecting Proteins with Biotechnological/Pharmacological and Therapeutic Applications. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine: eCAM**, 2017. v. 2017. Disponível em: <[pmc/articles/PMC5359455/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35359455/)>. Acesso em: 11 ago. 2023.

CONTER, M. *et al.* Characterization of antimicrobial resistance of foodborne *Listeria monocytogenes*. **International Journal of Food Microbiology**, 15 jan. 2009. v. 128, n. 3, p. 497–500. Acesso em: 17 fev. 2024.

CORIOLANO, M. C. *et al.* Immunomodulatory effects of the water-soluble lectin from *Moringa oleifera* seeds (WSMoL) on human peripheral blood mononuclear cells (PBMC). **Protein & Peptide Letters**, 31 jan. 2018. v. 25. Acesso em: 28 jan. 2024.

COSSART, P.; TOLEDO-ARANA, A. *Listeria monocytogenes*, a unique model in infection biology: an overview. **Microbes and Infection**, 1 jul. 2008. v. 10, n. 9, p. 1041–1050. Acesso em: 13 fev. 2024.

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**, ago. 2010. v. 50, n. 4, p. 434–447. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/rbr/a/QdW9KFBP3XsLvCYRJ8Q7SRb/>>. Acesso em: 28 jan. 2024.

DE ALCÂNTARA ALMEIDA, I. *et al.* Anti-inflammatory activity of caffeine (1,3,7-trimethylxanthine) after experimental challenge with virulent *Listeria monocytogenes* in Swiss mice. **International Immunopharmacology**, 1 nov. 2021. v. 100, p. 108090. Acesso em: 2 fev. 2024.

DE PAULO, L. F. *et al.* Inflamação: história, tipos e causas. **Uningá Review**. v. 1, n. 1, 2010. Disponível em: <https://revista.uninga.br/uningareviews/article/view/465>. Acesso em: 4 fev. 2024.

DIAS, R. O. *et al.* Insights into Animal and Plant Lectins with Antimicrobial Activities. **Molecules**, v. 20, n. 1, p. 519, 1 jan. 2015. Acesso em: 23 ago. 2023.

DISSON, O.; MOURA, A.; LECUIT, M. Making Sense of the Biodiversity and Virulence of *Listeria monocytogenes*. **Trends in Microbiology**, 1 set. 2021. v. 29, n. 9, p. 811–822. Acesso em: 20 fev. 2023.

ENOMA, S. *et al.* Antimicrobial Activities and Phylogenetic Study of *Erythrina senegalensis* DC (Fabaceae) Seed lectin. **BioTechnologia**, 2023. v. 104, n. 1, p. 21–32. Disponível em: <<https://doi.org/10.5114/bta.2023.125083>>. Acesso em: 5 set. 2023.

ETIENNE, R.; VIEGAS, F. P. D.; JR., C. V. Aspectos fisiopatológicos da inflamação e o planejamento de fármacos: uma visão geral atualizada. **Revista Virtual de Química**, 25 fev. 2021. v. 13, n. 1. Disponível em: <https://rvq-sub.sbq.org.br/index.php/rvq/article/view/3920>. Acesso em: 2 fev. 2024.

FIGUEIREDO, J. G. *et al.* Pharmacological analysis of the neutrophil migration induced by *D. rostrata* lectin: Involvement of cytokines and nitric oxide. **Toxicon**, 1 nov. 2009. v. 54, n. 6, p. 736–744. Acesso em: 25 jan. 2024.

GRANGEIRO, T. B. *et al.* Molecular cloning and characterization of ConBr, the lectin of *Canavalia brasiliensis* seeds. **European journal of biochemistry**, 1997. v. 248, n. 1, p. 43–48. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9310358/>>. Acesso em: 3 fev. 2024.

GONDIM, A. C. S. *et al.* Potent antiviral activity of carbohydrate-specific algal and leguminous lectins from the Brazilian biodiversity. **MedChemComm**, 20 mar. 2019. v. 10, n. 3, p. 390–398. Disponível em: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2019/md/c8md00508g>. Acesso em: 5 mar. 2023.

IORDACHE, F. *et al.* Antimicrobial and antiparasitic activity of lectins. **Current pharmaceutical biotechnology**, 20 jan. 2015. v. 16, n. 2, p. 152–161. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25594291/>>. Acesso em: 5 set. 2023.

IRETON, K. *et al.* Role of internalin proteins in the pathogenesis of *Listeria monocytogenes*. **Molecular Microbiology**, 1 dez. 2021. v. 116, n. 6, p. 1407–1419. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/mmi.14836>>. Acesso em: 5 set. 2023.

KATOCH, R.; TRIPATHI, A. Research advances and prospects of legume lectins. **Journal of Biosciences**, 1 dez. 2021. v. 46, n. 4. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/356868583/>>. Acesso em: 11 ago. 2023.

KATRLÍK, J. *et al.* Glycan and lectin microarrays for glycomics and medicinal applications. **Medicinal Research Reviews**, 1 mar. 2010. v. 30, n. 2, p. 394–418.

Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/med.20195>>. Acesso em: 28 jan. 2024.

KAYODE, A. J.; OKOH, A. I. Incidence and genetic diversity of multi-drug resistant *Listeria monocytogenes* isolates recovered from fruits and vegetables in the Eastern Cape Province, South Africa. **International Journal of Food Microbiology**, 16 fev. 2022. v. 363, p. 109513. . Acesso em: 17 fev. 2024.

KESHERWANI, V.; SODHI, A. Differential activation of macrophages in vitro by lectin Concanavalin A, Phytohemagglutinin and Wheat germ agglutinin: Production and regulation of nitric oxide. **Nitric Oxide**, 1 mar. 2007. v. 16, n. 2, p. 294–305. Acesso em: 12 fev. 2024.

KOLACZKOWSKA, E.; KUBES, P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. **Nature Reviews Immunology** 2013 13:3, 25 fev. 2013. v. 13, n. 3, p. 159–175. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/nri3399>>. Acesso em: 2 fev. 2024.

KRAYCHETE, D. C.; CALASANS, M. T. D. A.; VALENTE, C. M. L. Citocinas pró-inflamatórias e dor. **Revista Brasileira de Reumatologia**, 2006. v. 46, n. 3, p. 199–206. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/rbr/a/77FCtFTh4yCsqhyh375VzNm/>>. Acesso em: 2 fev. 2024.

LACHMANN, R. *et al.* Nationwide outbreak of invasive listeriosis associated with consumption of meat products in health care facilities, Germany, 2014–2019. **Clinical Microbiology and Infection**, 1 jul. 2021. v. 27, n. 7, p. 1035.e1-1035.e5. Acesso em: 6 mar. 2024.

LADO, B.; YOUSEF, A.E. Characteristics of *Listeria monocytogenes* Important to Food Processors. In: Ryser, E.T. and Marth, E.H., Eds., **Listeria, Listeriosis and Food Safety**, 3rd Edition, CRC Press, Boca Raton, Ch. 6, 157-213. 2007. Acesso em: 11 ago. 2023.

LAGARDA-DIAZ, I. *et al.* Legume Lectins: Proteins with Diverse Applications. **International Journal of Molecular Sciences**, 12 jun. 2017. v. 18, n. 6. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35486065/>>. Acesso em: 11 ago. 2023.

LAKICEVIC, B. *et al.* Wholegenome sequencing as the gold standard approach for control of *Listeria monocytogenes* in the food chain. **Journal of Food Protection**, 1 jan. 2023. v. 86, n. 1, p. 100003. Acesso em: 20 fev. 2023.

LANNOO, N.; DAMME, E. J. M. VAN. Lectin domains at the frontiers of plant defense. **Frontiers in Plant Science**, 13 ago. 2014. v. 5, n. AUG, p. 108308. Acesso em: 19 dez. 2023.

LECUIT, M. *Listeria monocytogenes*, a model in infection biology. **Cellular Microbiology**, 1 abr. 2020. v. 22, n. 4, p. e13186. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/cmi.13186>>. Acesso em: 20 fev. 2023.

LI, L. *et al.* Carrageenan and its applications in drug delivery. **Carbohydrate Polymers**, 15 mar. 2014. v. 103, n. 1, p. 1–11. Acesso em: 27 jan. 2024.

MATEREKE, L. T.; OKOH, A. I. *Listeria monocytogenes* Virulence, Antimicrobial Resistance and Environmental Persistence: A Review. **Pathogens** **2020**, Vol. **9**, Page **528**, 30 jun. 2020. v. 9, n. 7, p. 528. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2076-0817/9/7/528/htm>>. Acesso em: 20 fev. 2023.

MEDZHITOV, R. The spectrum of inflammatory responses. **Science**, 26 nov. 2021. v. 374, n. 6571, p. 1070–1075. Disponível em: <https://www.science.org/doi/10.1126/science.abi5200> . Acesso em: 2 fev. 2024.

MELO, C. M.L. DE *et al.* Mitogenic Response and Cytokine Production Induced by Cramoll 1,4 Lectin in Splenocytes of Inoculated Mice. **Scandinavian Journal of Immunology**, 1 fev. 2011. v. 73, n. 2, p. 112–121. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1365-3083.2010.02490.x>>. Acesso em: 28 jan. 2024.

MENEGUZZO, D. T. **Fototerapia com laser em baixa intensidade em processo inflamatório agudo induzido por carragenina em pata de camundongos - estudos de dosimetria**. 2010. Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/85/85134/tde-20062011-155725/>>. Acesso em: 6 set. 2023.

MISHRA, Abtar *et al.* Structure-function and application of plant lectins in disease biology and immunity. **Food and Chemical Toxicology**, 2019. v. 134, p. 110827. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0278691519306179>.

MOREIRA, R. A.; CAVADA, B. S. Lectin from *Canavalia brasiliensis* (MART.). isolation, characterization and behavior during germination. **Biologia Plantarum**, mar. 1984. v. 26, n. 2, p. 113–120. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/BF02902274> . Acesso em: 3 fev. 2024.

MORRIS, C. J. Carrageenan-induced paw edema in the rat and mouse. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, 2003. v. 225, p. 115–121. Disponível em: <<https://link.springer.com/protocol/10.1385/1-59259-374-7:115>>. Acesso em: 6 set. 2023.

MURAPA, P. *et al.* Heat shock factor 1 protects mice from rapid death during *Listeria monocytogenes* infection by regulating expression of tumor necrosis factor alpha during fever. **Infection and Immunity**, 18 jan. 2011. v. 79, n. 1, p. 177–184. Disponível em: <<https://journals.asm.org/doi/10.1128/iai.00742-09>>. Acesso em: 3 fev. 2024.

MCLAUCHLIN, J. *et al.* An outbreak of human listeriosis associated with frozen sweet corn consumption: Investigations in the UK. **International Journal of Food Microbiology**, 2 jan. 2021. v. 338, p. 108994. Acesso em: 6 mar. 2024.

MYERS, M. J.; DEEVER, C. M.; LEWANDOWSKI, A. J. Molecular mechanism of action responsible for carrageenan-induced inflammatory response. **Molecular Immunology**, 1 maio. 2019. v. 109, p. 38–42. Acesso em: 27 jan. 2024.

NASCIMENTO, D. C. O. *et al.* Latex protein extracts from *Calotropis procera* with immunomodulatory properties protect against experimental infections with *Listeria*

monocytogenes. *Phytomedicine*, v. 23, n. 7, p. 745-753, 2016. Acesso em: 12 ago. 2023.

NECAS, J.; BARTOSIKOVA, L. Carrageenan: A review. *Veterinarni Medicina*, 2013. v.58, n. 4, p. 187–205. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/280020831_Carrageenan_A_review . Acesso em: 6 set. 2023.

NOURSHARGH, S.; ALON, R. Leukocyte Migration into Inflamed Tissues. *Immunity*, 20 nov. 2014. v. 41, n. 5, p. 694–707. Disponível em: <http://www.cell.com/article/S1074761314003847/fulltext> . Acesso em: 2 fev. 2024.

OLIVEIRA, J. F. C. **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. Disponível em: <<https://tede.unioeste.br/handle/tede/3931>>. Acesso em: 31 jan. 2024.

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*, 3 mar. 2022. v. 39, n. 5, p. 599–608. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s10719-022-10048-w>>. Acesso em: 5 set. 2023.

OLIVEIRA, F. S. *et al.* Immunostimulatory activity of ConBr: A focus on splenocyte proliferation and proliferative cytokine secretion. *Cell and Tissue Research*, 19 out. 2011. v. 346, n. 2, p. 237–244. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00441-011-1239-x> . Acesso em: 5 set. 2023.

PACHECO, A. G. M. *et al.* Atividade antinociceptiva e anti-inflamatória de *Hymenaea martiana* Hayne (Fabaceae) em camundongos. *Brazilian Journal of Biology*, 2022. v. 82, p. 1–9. . Acesso em: 6 set. 2023.

PATRIOTA, L. L. S. *et al.* Inhibition of Carrageenan-Induced Acute Inflammation in Mice by the Microgramma vacciniifolia Frond Lectin (MvFL). *Polymers* **2022, Vol. 14, Page 1609**, 15 abr. 2022. v. 14, n. 8, p. 1609. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2073-4360/14/8/1609/htm>>. Acesso em: 27 jan. 2024.

PINTO, N. V. *et al.* Effects of *Canavalia* lectins on acute inflammation in sensitized and non-sensitized rats. *Inflammation*, jun. 2013. v. 36, n. 3, p. 713–722. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23377963/>>. Acesso em: 15 jan. 2024.

PIRES, A. F. *et al.* Opioid-like antinociceptive effects of oral administration of a lectin purified from the seeds of *Canavalia brasiliensis*. *Fundamental & Clinical Pharmacology*, 1 abr. 2013. v. 27, n. 2, p. 201–209. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1472-8206.2011.00987.x>>. Acesso em: 27 jan. 2024.

PITTS, M. G.; D'ORAZIO, S. E. F. A Comparison of Oral and Intravenous Mouse Models of Listeriosis. *Pathogens* **2018, Vol. 7, Page 13**, 20 jan. 2018. v. 7, n. 1, p. 13. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2076-0817/7/1/13/htm>>. Acesso em: 2 fev. 2024.

REIS, E. A. G. *et al.* Potential immunomodulatory effects of plant lectins in *Schistosoma mansoni* infection. **Acta Tropica**, 1 nov. 2008. v. 108, n. 2–3, p. 160–165. Acesso em: 27 jan. 2024.

RODRIGUES, C. L. C. *et al.* Avaliação da atividade anti-inflamatória do extrato hidroalcoólico do caroço de abacate sobre a peritonite induzida pela carragenina em ratos. DOI: <http://dx.doi.org/10.5892/ruvrd.v13i1.2305>. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, 20 set. 2015. v. 13, n. 2, p. 367–376. Disponível em: <<http://periodicos.unincor.br/index.php/revistaunincor/article/view/2305>>. Acesso em: 6 set. 2023.

RODRIGUES, C.S. *et al.* An overview of *Listeria monocytogenes* contamination in ready to eat meat, dairy and fishery foods. *Ciência Rural*, v. 47, n. 2, p. 1–8, 2017. Acesso em: 07mar. 2024.

RODRIGUEZ, D. *et al.* Differences in macrophage stimulation and leukocyte accumulation in response to intraperitoneal administration of glucose/mannose-binding plant lectins. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, 1 jan. 1992. v. 25, n. 8, p. 823–826. Disponível em: <https://europepmc.org/article/med/1342615>. Acesso em: 10 fev. 2024.

SALES GUEDES, R. *et al.* Fenologia reprodutiva e biologia da polinização de *Canavalia brasiliensis* Mart. ex Benth (Fabaceae). **Biotemas**, 31 ago. 2009. v. 22, n. 1, p. 27–37. Disponível em: <https://periodicos.ufsc.br/index.php/biotemas/article/view/21757925.2009v22n1p2>. Acesso em: 5 set. 2023.

SANTANA, L. N. *et al.* Anti-infective activity of *Cratylia argentea* lectin (CFL) against experimental infection with virulent *Listeria monocytogenes* in Swiss mice. **Phytomedicine**, 1 jan. 2022. v. 94, p. 153839. Acesso em: 11 ago. 2023.

SANTOS, A. J. C. A. *et al.* Schinus terebinthifolia leaf lectin (SteLL) is an immunomodulatory agent by altering cytokine release by mice splenocytes. **3 Biotech**, 1 abr. 2020. v. 10, n. 4, p. 1–9. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s13205-020-2137-2>. Acesso em: 31 jan. 2024.

SILVA, A. F. B. **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. Acesso em: 24 ago. 2023.

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**, 1 fev. 2016. v. 31, p. 233–238. Acesso em: 3 jan. 2024.

SILVA, E. N. Da *et al.* Aspectos gerais das lectinas vegetais. **Latin American Journal of Development**, 17 nov. 2022. v. 4, n. 6, p. 1955–1964. Disponível em: <<https://ojs.latinamericanpublicacoes.com.br/ojs/index.php/jdev/article/view/1200>>. Acesso em: 19 dez. 2023.

SILVA, F. O. *et al.* Perfil de proteases de lesões cutâneas experimentais em camundongos tratadas com alectina isolada das sementes de *Canavalia brasiliensis*. **Revista Ciência Rural**, Santa Maria RS, v. 39, n. 6, p. 1808-1814, set. 2009. Acesso em: 27 jan. 2024.

SILVA, F. De O. *et al.* Antiproliferative effect of *Canavalia brasiliensis* lectin on B16F10 cells. **Research in Veterinary Science**, 1 abr. 2014. v. 96, n. 2, p. 276–282. Acesso em: 27 jan. 2024.

SILVA, F. O. *et al.* Immunostimulatory activity of ConBr: A focus on splenocyte proliferation and proliferative cytokine secretion. **Cell and Tissue Research**, v. 346, n. 2, p. 237–244, 19 out. 2011. Acesso em: 11 ago. 2023.

SILVA, F. De O. **Atividade moduladora da lectina isolada das sementes de *Canavalia brasiliensis***. 2012. 110 f. Tese (Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife. Disponível em: <<http://www.tede2.ufrpe.br:8080/tede2/handle/tede2/4585>>. Acesso em: 5 set. 2023.

SILVA, G. P; CARVALHO, F. C.; ROQUE-BARREIRA, M. C. Neutrophil activation induced by plant lectins: Modulation of inflammatory processes. **Inflammation and Allergy - Drug Targets**, 2012. v. 11, n. 6, p. 433–441. Acesso em: 10 fev. 2024.

SILVA, J. D. F. DA *et al.* *Portulaca elatior* root contains a trehalose-binding lectin with antibacterial and antifungal activities. **International Journal of Biological Macromolecules**, 1 abr. 2019. v. 126, p. 291–297. Acesso em: 31 jan. 2024.

SILVA, S. P. DA *et al.* Purification, Characterization, and Assessment of Antimicrobial Activity and Toxicity of *Portulaca elatior* Leaf Lectin (PeLL). **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, 21 ago. 2021. v. 15, n. 2, p. 287–299. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s12602-021-09837-w>>. Acesso em: 11 ago. 2023.

SODRÉ FILHO, J. *et al.* Fitomassa e cobertura do solo de culturas de sucessão ao milho na Região do Cerrado Phytomass and soil cover of sequential crops after maize in Cerrado region. **Pesq. agropec. bras**, 2004. p. 327–334. Acesso em: 8 dez. 2023.

SONG, H. I. *et al.* Dark treatment effect on the carrageenan characterization in a red alga, *Chondrus crispus*. **Algal Research**, 1 nov. 2022. v. 68, p. 102889. . Acesso em: 1º fev. 2024.

SOUZA, B. R. D. K. *et al.* O modelo de dor inflamatória induzida pela carragenina como estratégia para avaliar a ação de drogas sobre a dor miofascial. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, 5 dez. 2020. v. 19, n. 3, p. 507–513. Disponível em: <<https://periodicos.ufba.br/index.php/cmbio/article/view/42460>>. Acesso em: 6 set. 2023.

SOUZA, M. A. *et al.* The immunomodulatory effect of plant lectins: a review with emphasis on ArtinM properties. **Glycoconjugate Journal** 2013 30:7, 9 jan. 2013. v. 30, n. 7, p. 641–657. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s10719-012-9464-4>>. Acesso em: 31 jan. 2024.

SHERWOOD, E. R.; TOLIVER-KINSKY, T. Mechanisms of the inflammatory response. **Best Practice & Research Clinical Anaesthesiology**, 1 set. 2004. v. 18, n. 3, p. 385–405. Acesso em: 26 jan. 2024.

PONZIO, E. *et al.* Epidemiology of listeriosis in a region in central Italy from 2010 to 2019: Estimating the real incidence and space-time analysis for detecting cluster of cases. **Journal of Infection and Public Health**, 1 dez. 2023. v. 16, n. 12, p. 1904–1910. Acesso em: 6 mar. 2024.

TAVARES, L, S. *et al.* Reference genes for gene expression profiling in mouse models of *Listeria monocytogenes* infection. **BIOTECHNIQUES**, v. 76, p. 1-10, 2023. Acesso em: 29 fev. 2024.

TOLEDO, K. A. *et al.* Neutrophil activation induced by ArtinM: Release of inflammatory mediators and enhancement of effector functions. **Immunology Letters**, 24 mar. 2009. v. 123, n. 1, p. 14–20. Acesso em: 25 jan. 2024.

TOWNSEND, A. *et al.* A Systematic Review of Listeria Species and *Listeria monocytogenes* Prevalence, Persistence, and Diversity throughout the Fresh Produce Supply Chain. *Foods* 2021, Vol. 10, Page 1427, v. 10, n. 6, p. 1427, 20 jun. 2021. Acesso em: 24 jan. 2023.

THOMAS, J. *et al.* Outbreak of Listeriosis in South Africa Associated with Processed Meat. **The New England journal of medicine**, 2 fev. 2020. v. 382, n. 7, p. 632. Disponível em: </pmc/articles/PMC7301195/>. Acesso em: 6 mar. 2024.

YAN, S. *et al.* Susceptibility (re)-testing of a large collection of *Listeria monocytogenes* from foods in China from 2012 to 2015 and WGS characterization of resistant isolates. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 1 jul. 2019. v. 74, n. 7, p. 1786–1794. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1093/jac/dkz126>>. Acesso em: 17 fev. 2024.

WALLACH, D.; KANG, T. B.; KOVALENKO, A. Concepts of tissue injury and cell death in inflammation: a historical perspective. *Nature reviews. Immunology*, jan. 2014. v. 14, n. 1, p. 51–59. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24336099/>>. Acesso em: 3 fev. 2024.

WARRINER, K.; NAMVAR, A. What is the hysteria with Listeria? **Trends in Food Science & Technology**, 1 jul. 2009. v. 20, n. 6–7, p. 245–254. Acesso em: 6 set. 2023.

WOLIN, Ingrid A.V. *et al.* ConBr lectin modulates MAPKs and Akt pathways and triggers autophagic glioma cell death by a mechanism dependent upon caspase-8 activation. **Biochimie**, 1 jan. 2021. v. 180, p. 186–204. Acesso em: 31 jan. 2024.

ZHANG, J. M.; AN, J. Cytokines, inflammation, and pain. **International Anesthesiology Clinics**, mar. 2007. v. 45, n. 2, p. 27–37. Disponível em: <https://journals.lww.com/anesthesiaclinics/fulltext/2007/04520/cytokines,_inflammation,_and_pain.4.aspx>. Acesso em: 2 fev. 2024.