

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
Programa de Pós-Graduação em Patologia**

**AVALIAÇÃO DE CANDIDATAS À VACINA CONTRA LISTERIOSE
EM MODELO MURINO**

CLÁUDIA EMANUELA VIANA ROCHA

**Belo Horizonte
Instituto de Ciências Biológicas - UFMG
2020**

Cláudia Emanuela Viana Rocha

**AVALIAÇÃO DE CANDIDATAS À VACINA CONTRA LISTERIOSE
EM MODELO MURINO**

Defesa de tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da UFMG, Instituto de Ciências Biológicas, como requisito para a obtenção do título de Doutor.

Curso: Doutorado em Patologia

Linha de Pesquisa: Imunopatologia das doenças infecciosas

Orientador: Tatiane Alves da Paixão

Coorientadores: Renato de Lima Santos

**Belo Horizonte
Instituto de Ciências Biológicas - UFMG
2020**

043 Rocha, Cláudia Emanuela Viana.
Avaliação de candidatas à vacina contra listeriose em modelo murino
[manuscrito] / Cláudia Emanuela Viana Rocha. - 2020.
93 f. : il. ; 29,5 cm.
Orientador: Tatiane Alves da Paixão. Coorientador: Renato de Lima Santos.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de
Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Patologia.
1. Patologia. 2. Listeria monocytogenes. 3. Camundongos. 4. Vacinas. 5.
Alginatos. 6. Quitosana. I. Paixão, Tatiane Alves da. II. Santos, Renato de Lima.
III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV.
Título.

CDU: 616


FOLHA DE APROVAÇÃO

“AVALIAÇÃO DE CANDIDATAS À VACINA CONTRA LISTERIOSE EM MODELO MURINO”

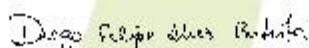
CLAUDIA EMANUELA VIANA ROCHA

Tese submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Patologia, como requisito para obtenção do grau de Doutor em **PATOLOGIA**, área de concentração **PATOLOGIA INVESTIGATIVA**.

Aprovada em 04 de maio de 2020, pela banca constituída pelos membros:



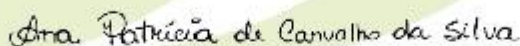
Prof.ª. Dra. Anna Christina de Almeida
Instituto de Ciências Agrárias – Campus Montes Claros/UFMG



Dr. Diego Felipe Alves Batista
Departamento Clínica e Cirurgia Veterinária – Escola de Veterinária/UFMG



Profa. Dra. Elaine Maria Seles Dorneles
Departamento Medicina Veterinária – Universidade Federal de Lavras



Profa. Dra. Ana Patrícia de Carvalho da Silva
Departamento Patologia – Universidade Federal de Tocantins



Profa. Dra. Tatiane Alves Paixão - ICB/UFMG
ORIENTADORA

Belo Horizonte, 04 de maio de 2020.

Agradecimentos

A minha caminhada dentro da UFMG começou sendo apoio técnico de laboratório e, posteriormente, através da Profa Tatiane Paixão, realizei o mestrado e doutorado em Patologia. Difícil colocar em palavras o quanto sou grata a Deus e as pessoas por todo esse período.

A prof^a Tatiane Paixão, meu exemplo profissional, por ser minha orientadora e ter sido luz nessa caminhada. Obrigada pelos ensinamentos, apoio, paciência, amizade e auxílio em desvendar o mundo da pesquisa, exigindo sempre o meu melhor.

Ao meu coorientador prof^o Renato de Lima, pela oportunidade de trabalhar com o senhor como integrante do grupo de estudos e do laboratório de Patologia Molecular; Por me ensinar, apoiar, incentivar e ser exemplo de professor fazendo ciência.

Aos colaboradores prof^a Daniella Bartholomeu e prof^o Ricardo Fujiwara pela ajuda e suporte, permitindo trabalhar no laboratório de Imunologia e Genômica de Parasitos ICB, da mesma maneira, ao prof^o Daniel de Assis do laboratório de Micologia ICB.

Aos meus amigos da pós-graduação pela parceria, amizade e ajuda fundamental no desenvolvimento dos trabalhos, Monique, Thaynara, Andressa, Luana, Mariana, Camila Eckstein, Tatiane Carvalho, Diego Batista, Guilherme Gomide, Bruno, Pâmela, Noely e Juliana Mol.

A todos os outros amigos e colegas da pós-graduação que tanto compartilhamos alegrias e dificuldades nessa jornada, auxiliaram no meu crescimento e conhecimento profissional, Matheus Vilaro, Ricardo Laub, Luisa Viana, Amanda Gabrielle, Luciana Fachini, Fabíola, Frank, Daniel, Ayisa, Jefferson, Heloisa, Amanda Sena, Eliana Toscano, Tamara, Emerson, Quezya, Daniele e Mayra.

Aos professores e funcionários do Departamento de Patologia – ICB e do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária que foram sempre atenciosos e preocupados com meu sucesso, em especial, prof^a Milene, prof^a Helen, prof^o Giovanni, prof^o Enio, prof^o Ricardo, Dona Beth, Leimar, Natália, João, Valéria, Luiz, Walmiro, Iago.

A Família Rocha, por estar sempre ao meu lado acreditando na minha capacidade. Em especial a minha avó (in memoriam), com sua fé inabalável, me ajudou a ser mais serena e a acreditar em “tudo posso naquele que me fortalece”. Meu reconhecimento a Família Viana e Família Silva pela torcida, apoio e cuidado.

Aos meus pais, irmãos e marido pelo carinho, força, confiança e incentivo. Juntos, o impossível se transforma em um obstáculo a ser vencido. Essa conquista é nossa!

A todos os animais utilizados em experimentação, que permitiu o desenvolvimento do trabalho e realização de descobertas. À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de Estudo e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo apoio financeiro para o desenvolvimento deste projeto.

Obrigada Senhor por mais uma etapa finalizada em minha vida e por todas as bênçãos, saúde e sabedoria adquirida.

RESUMO

Listeria monocytogenes é o agente causador da listeriose humana e animal, capaz de atravessar as barreiras hematoencefálica e fetoplacentária provocando danos severos à saúde. Trata-se de uma doença zoonótica que resulta em surtos graves de ocorrência esporádica em todo o mundo. Considerando as consequências que a listeriose provoca nos seres humanos e nos ruminantes pouco tem sido desenvolvido para combater a infecção. A vacinação é uma importante ferramenta de combate a doenças provocadas por microorganismos. Construção de vacinas contra patógenos intracelulares é desafiador, pois estas precisam estimular de forma eficiente células T de memória. Algumas pesquisas têm focado no desenvolvimento de vacinas contra *L. monocytogenes* utilizando vacina viva atenuada, morta ou inativada, compostas por proteínas ou peptídeos, sempre com o objetivo de facilitar a apresentação dos antígenos. Alguns indicadores de falhas na construção de vacinas contra listeriose são: a insegurança de trabalhar com vacina viva atenuada por receio de provocar doença; vacina morta ou inativada falhar na proteção do hospedeiro; na dificuldade de indução de resposta imune protetora de proteínas/antígenos imunogênicos de *L. monocytogenes* associados aos adjuvantes de resposta Th1 e a dificuldade de encontrar potentes adjuvantes. Dessa forma, nossos estudos foram voltados para a construção de duas vacinas seguras contra listeriose em modelo murino, sendo: uma vacina constituída por *L. monocytogenes* inativada por irradiação Gamma (KLM- γ) associada às microcápsulas de alginato-quitosana, utilizados como adjuvantes; uma segunda vacina constituída por uma proteína quimérica (LM22QR), construída a partir de epítomos de *L. monocytogenes* preditos para células T de camundongo. A vacina constituída por KLM- γ -alginato-quitosana foi capaz de proteger camundongos da colonização bacteriana com mais de um log de diferença comparado ao grupo controle, com menores lesões hepáticas. A vacina também protegeu camundongos ao desafio bacteriano letal e foi capaz de estimular a proliferação celular com produção de citocinas como, interferon gamma (IFN- γ) e interleucina 10 (IL-10). A construção da vacina recombinante LM22QR foi realizada utilizando a predição *in silico* como ferramenta. Assim, após análise de sobreposição com fusão de peptídeos que seriam reconhecidos pelo complexo principal de histocompatibilidade (MHC I e MHC II) de célula T de camundongos, 22 peptídeos de *L. monocytogenes* foram selecionados para a formação de uma única proteína, denominada LM22QR. Um estudo preliminar utilizando camundongos vacinados com a proteína LM22QR associada ao adjuvante de Freund's (PrQ + FA) demonstrou redução da carga bacteriana em órgãos alvos, com ausência de mortalidade ao desafio de *L. monocytogenes*. O mesmo não foi observado no grupo vacinado apenas com a proteína LM22QR. Novas avaliações deverão ser realizadas futuramente com intuito de confirmar o real poder imunogênico da proteína quimérica LM22QR. Por fim, as duas vacinas construídas no desenvolvimento desse trabalho incentivam o desenvolvimento de vacinas seguras contra listeriose.

Palavras-chave: *L. monocytogenes*, camundongo, vacina, alginato, quitosana, proteína quimérica

ABSTRACT

L. monocytogenes is the causative agent of human and animal listeriosis, capable of crossing blood-brain and fetoplacental barriers causing serious damage to health. It is a zoonotic disease that results in severe outbreaks of sporadic occurrence worldwide. Little has been developed to fight this infection in humans and animals (mainly ruminants). Vaccination is the best method of combating diseases caused by microorganisms. Controlling vaccines against intracellular pathogens is challenging as it requires the efficient form of memory T cells. Some research has been dedicated to the development of vaccines against *L. monocytogenes* that use live-attenuated or inactivated organisms, recombinant proteins or peptides always with the objective of facilitating the presentation of antigens. Failures in the design of efficient vaccines against listeriosis are often assigned (i) to the possibility of live-attenuated organism to cause disease in some individuals, (ii) to low protection levels achieved by vaccination with inactivated organism and (iii) to the difficulty at finding potent adjuvant inducers of Th1 immune response to enhance the immunogenicity of recombinant proteins or *L. monocytogenes* antigens. Thus, our studies were focused on the construction of two safe vaccines against listeriosis in the murine model: a developed from by *L. monocytogenes* inactivated by Gamma irradiation (KLM- γ) associated with alginate-chitosan microcapsules, as adjuvants; a second vaccine controlled by a chimera protein (LM22QR), built from epitopes of *L. monocytogenes* predicted for murine T cells. The vaccine containing KLM- γ -alginate-chitosan was able to protect mice from bacterial colonization with less liver damage, stimulate cell proliferation and production of cytokines, interferon gamma (IFN- γ) and interleukin 10 (IL-10), and was able to prevent the mortality of animals vaccinated against the lethal bacterial challenge. The recombinant vaccine LM22QR was designed through *in silico* prediction. Thus, after analyzing the composition and fusion of peptides recognized by the major histocompatibility complex (MHC I and MHC II) of the mouse T cell, a total of 22 *L. monocytogenes* peptides were selected for the formation of a single protein called LM22QR. A preliminary study using mice vaccinated with the chimera protein LM22QR was associated with Freund's adjuvant (PrQ + FA). In this experiment, it was possible to observe mice vaccinated with PrQ + FA, reducing the bacterial load on the organs and the loss of mortality when challenged by *L. monocytogenes*. The same was not observed in the group of animals vaccinated with the chimera protein LM22QR alone. New analyzes needed to be performed in the future in order to confirm the real immunogenicity of the chimera protein LM22QR. Finally, the two vaccines developed in this work encourage the development of safe vaccines against listeriosis.

Key-words: *L. monocytogenes*, mice, vaccine, alginate, chitosan, chimera protein

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Estudos de vacinas contra listeriose em modelo murino	26 e 27
Tabela 2 – Índice de proteção vacinal dos diferentes grupos vacinados	60
Tabela 3 – Referências das cepas de <i>Listeria</i> depositadas no NCBI selecionadas para predição imunogênica	77
Tabela 4 – Proteínas imunogênicas selecionadas para predição <i>in silico</i>	77
Tabela 5 – Total de epítomos preditos <i>in silico</i> para MHC I de células T	83
Tabela 6 – Total de epítomos preditos <i>in silico</i> para MHC II de células T	84
Tabela 7 – Epítomos preditos selecionados para construção da proteína LM22QR	84

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Imagem por microscopia óptica de microcápsulas KLM- γ -alginato com ou sem quitosana (400x). (A) alginato de KLM- γ medindo 500 - 550 μm (B) KLM- γ -alginato-quitosana medindo 500 - 615 μm . As microcápsulas contidas 1×10^8 KLM- γ foram inoculadas por via subcutânea em camundongos. (C) Desenho experimental da vacinação com microcápsulas de KLM- γ -alginato. (i) Ensaio de proteção vacinal em camundongos vacinados com duas doses, intercaladas entre duas semanas, e desafiados com 1×10^5 UFC *L. monocytogenes*. Material para bacteriologia e histopatologia foram realizadas após 4 dias de infecção; (ii) Ensaio de sobrevivência de camundongos vacinados com duas doses intercaladas entre duas semanas e desafiados com 4×10^6 UFC de *L. monocytogenes*. Mortalidade foi avaliada diariamente por duas semanas; (iii) Ensaio de esplenócitos *in vitro*, os camundongos foram vacinados com duas doses intercaladas entre duas semanas e desafiados com 1×10^5 UFC de *L. monocytogenes*. Quatorze dias após segunda dose, os esplenócitos dos camundongos vacinados foram removidos para estímulo *in vitro*. 53

Figura 2 - Escolha da dose infectante de *L. monocytogenes* 4b em camundongo Balb/c. Camundongos foram desafiados via i.p. utilizando 1×10^4 /animal e 1×10^5 UFC/animal nas fases logarítmica e estacionária observados por até sete dias. A seleção da dose e fase de crescimento bacteriano dos experimentos seguintes foi determinada de acordo com a contagem bacteriana encontrada no fígado. (A) Carga bacteriana encontrada no baço e (B) fígado de camundongos desafiados com 1×10^4 UFC/animal; (C) Carga bacteriana encontrada no baço e (D) fígado de camundongos desafiados com 1×10^5 UFC/animal; Os dados foram transformados em dados logarítmicos e submetidos a one-way ANOVA e as médias comparadas pelo teste de Tukey (* $p < 0,05$). 57

Figura 3 – Recuperação bacteriana no baço e fígado de camundongos vacinados e desafiados com dose subletal de *L. monocytogenes*. Camundongos vacinados com *L. monocytogenes* gama irradiada (KLM- γ); KLM- γ + hidróxido de alumínio (KLM- γ + Alum), KLM- γ + adjuvante de Freund (KLM- γ + FA), PBS (não vacinados), KLM- γ -alginato (KLM- γ + Alg), KLM- γ -alginato-quitosana (KLM- γ - + Alg + Qui) ou cápsulas vazias de alginato + quitosana (Alg + Qui). O baço e o fígado foram coletados no quarto dia após o desafio com 1×10^5 UFC *L.monocytogenes*/camundongo via i.p. Cada ponto representa um camundongo e as barras indicam desvio padrão. Os dados foram transformados em dados logarítmicos e submetidos a one-way ANOVA e as médias comparadas pelo teste de Tukey (* $p < 0,05$). 59

Figura 4 - Histopatologia hepática de camundongos vacinados e desafiados com dose subletal de *L. monocytogenes*. Camundongos (n = 5 ou 6) imunizados e desafiados com 1×10^5 *L. monocytogenes*/camundongo via intraperitoneal. No quarto dia após o desafio, o fígado de camundongos foi coletado e avaliado quanto à lesão inflamatória e necrose. O escore inflamatório foi dado de acordo com a intensidade das lesões: 0, ausência; 1, discreto; 2, moderado; 3, intenso. As áreas de necrose foram avaliadas com presença (1) ou ausência (0). (A) Necrose multifocal associada a intenso infiltrado neutrofilico em camundongos não vacinados infectados com *L. monocytogenes* (200 X); (B) Presença bacteriana de *L. monocytogenes* marcadas em vermelho no fígado de camundongos não vacinados infectados (200 X); (C) Pequenas áreas de necrose associado a infiltrado histiocítico multifocal discreto em camundongos vacinados com KLM- γ -alginato (200 X); (D) *L. monocytogenes* marcadas discretamente em vermelho em camundongos vacinados com KLM- γ -alginato; (200 X); (E) Avaliação de escore de fígado dos animais vacinados e desafiados com *L. monocytogenes* comparado com o grupo não vacinado. (* p<0,05).

61

Figura 5 – Curva de sobrevivência e curva de ganho de peso de camundongos vacinados e desafiados com dose letal de *L. monocytogenes*. Dez camundongos Balb/c por grupo: não vacinados; vacinado com adjuvante de Freund (FA); KLM- γ com adjuvante de Freund (KLM- γ + FA); KLM- γ encapsulado com alginato (KLM- γ + Alg); O KLM- γ encapsulado com alginato-quitosana (KLM- γ + Alg + Qui) foram imunizados e desafiados com uma dose letal de 4×10^6 CFU/camundongo e observado por 14 dias. Os animais foram pesados com mortalidade registrada diariamente. (A) Curva de sobrevivência de camundongos vacinados e desafiados. Os dados são expressos como uma porcentagem de animais sobreviventes e foram submetidos ao teste Log-Rank (p <0,01); (B) Peso diário de camundongos desafiados com dose letal de *L. monocytogenes*. O dia "0" representa o dia do desafio. Cada ponto representa o peso médio por grupo por 14 dias.

63

Figura 6 – Resposta imune de esplenócitos de camundongos Balb/c vacinados e estimulados com KLM- γ . Quatorze dias após a vacinação, os baços de camundongos (n = 6 ou 7) foram retirados assepticamente e os esplenócitos (5×10^5 células/poço) foram estimulados com RPMI (Meio) ou KLM- γ (1×10^9 UFC/mL) por 72 horas em duplicatas. A resposta proliferativa foi avaliada pelo ensaio MTT. (A) Proliferação de esplenócitos estimulados com RPMI ou KLM- γ ; (B) Quantificação de IFN- γ e (C) IL-10 a partir de esplenócitos. O sobrenadante dos esplenócitos foi removido após 72 horas e os níveis de citocinas foram avaliados por ELISA. Os dados representam as médias e o desvio padrão. Os dados foram

65

submetidos à ANOVA One-Way e comparados pelo teste de Tukey. (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ * $p < 0,001$).

Figura 7 – Construção da proteína quimérica recombinante LM22QR (A) Sequência da proteína quimérica proposta iniciada com metionina e com 22 epítomos preditos selecionados separados por sequência linker de 3xGli. (B) Sequência de nucleotídeos clonados em pET28a (+) nos sítios NcoI e XhoI gerando o plasmídeo PRQLM. (C) Proteína quimérica recombinante final no plasmídeo de PRQLM. Metionina (negrito), epítomos (preto), sequência 3xGli (vermelho) e 6xHis (azul), sítio de enzima de restrição (sublinhado), códon finalizador (laranja), nucleotídeo adicionados para ajuste de frame (verde). **86**

Figura 8 – Análise da expressão, solubilidade e purificação da proteína recombinante quimérica LM22QR em SDS/PAGE. O plasmídeo PRQLM foi clonado em *E. coli* BL21, e a bactéria transformada foi induzida com IPTG. (A) Gel SDS com expressão forte da proteína LM22QR com 33 kda em *E. coli* BL21 transformada e induzida com IPTG, presente na fração insolúvel do extrato bruto. Identificação das canaletas: (1) peso molecular; (2) *E. coli* BL21 vazia não induzida; (3) *E. coli* BL21 vazia induzida; (4) *E. coli* BL21 com transformada não induzida; (5) *E. coli* BL21 transformada induzida; (6) Fração solúvel do lisado bruto de *E. coli* BL21 transformada induzida; (7) Fração insolúvel lisado bruto de *E. coli* BL21 transformada induzida. (B) Gel SDS da proteína LM22QR com 33 kda após purificação por coluna de cromatografia de afinidade (1) Peso Molecular e (2) proteína LM22QR; (C) *Western blot* com marcação anti-6xHIS da proteína LM22QR. Ordem das canaletas representa: (1) proteína LM22QR purificada; (2) *E. coli* BL21 transformada induzida; (3) *E. coli* BL21 transformada não induzida. **87**

Figura 9 – Carga bacteriana encontrada no baço e fígado de camundongos vacinados com proteína quimérica LM22QR. Camundongos foram vacinados com proteína LM22QR (PrQ) e com a proteína LM22QR associada ao adjuvante de Freund's (PrQ + FA); (A) Recuperação bacteriana de baço (B) Recuperação bacteriana de fígado; (+) óbito de camundongos antes do dia da eutanásia (Test T de student * $p < 0,005$). **88**

SUMÁRIO

RESUMO	05
ABSTRACT	06
INTRODUÇÃO	12
CAPÍTULO I - REVISÃO DE LITERATURA	16
1. A LISTERIOSE HUMANA	16
2. LISTERIOSE EM ANIMAIS	17
3. EPIDEMIOLOGIA DA LISTERIOSE	18
4. PATOGÊNESE E RESPOSTA IMUNE CONTRA A INFECÇÃO	20
4.1 – Resposta imune inata	20
4.2 – Resposta imune adaptativa	22
5. DESENVOLVIMENTO VACINAL CONTRA LISTERIOSE	23
5.1 – Adjuvantes em vacinas contra listeriose	28
5.2 – Vacinas inativadas de <i>L. monocytogenes</i>	29
5.3 – <i>L. monocytogenes</i> como vetor vacinal	30
6. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA	32

CAPÍTULO II – EFICÁCIA VACINAL DE *LISTERIA MONOCYTOGENES* GAMMA IRRADIADA MICROENCAPSULADA EM ALGINATO E QUITOSANA CONTRA LISTERIOSE EM MODELO MURINO

RESUMO	47
ABSTRACT	48
INTRODUÇÃO	49
MATERIAL E MÉTODOS	51
RESULTADOS	57
DISCUSSÃO	66
CONCLUSÃO	68
REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA	69

CAPÍTULO III – CONSTRUÇÃO DE PROTEÍNA QUIMÉRICA CONSTITUÍDA DE EPÍTOPOS PREDITOS DE *L. MONOCYTOGENES* CANDIDATA A VACINA CONTRA LISTERIOSE EM MODELO MURINO

INTRODUÇÃO	74
MATERIAL E MÉTODOS	76
RESULTADOS	83
DISCUSSÃO	89
CONCLUSÃO	90
REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA	91

INTRODUÇÃO

Bactérias do gênero *Listeria* spp. são capazes de infectar vários tipos de animais, predominantemente mamíferos incluindo ruminantes e roedores, mas também, anfíbios, peixes, artrópodes e aves (Hellström et al., 2008; Posfay-Barbe e Wald, 2009). São bactérias Gram-positivo, encontradas amplamente no meio ambiente (Vázquez-Boland et al., 2001; Posfay-Barbe e Wald, 2009; Toyoshima et al., 2006) como no solo, água, vegetais e alimentos (Vázquez-Boland et al., 2001; Posfay-Barbe e Wald, 2009).

Listeria monocytogenes é considerada a espécie mais patogênica do gênero *Listeria* (Abram et al., 2003). A infecção pela bactéria é responsável por causar a doença conhecida por listeriose, uma doença infecciosa zoonótica, adquirida pela ingestão de alimentos contaminados (Farber e Peterkin, 1991; Vázquez-Boland et al., 2001).

A infecção ocorre via oral, após a ingestão de alimentos contaminados. As bactérias presentes no lúmen intestinal multiplicam-se e atravessam a barreira intestinal, disseminando para linfonodos mesentéricos, baço e fígado. Consequentemente, podem alcançar e atravessar as barreiras hematoencefálica ou fetoplacentária (Bonazzi et al., 2009; Gessain et al., 2015).

A listeriose em ruminantes é descrita sob duas formas: a listeriose neurológica e listeriose materno-fetal. Os sinais clínicos apresentados pelos animais acometidos pela listeriose neurológica são decorrentes da lesão do tronco cerebral (Low e Donachie, 1997; Nightingale et al., 2004). A listeriose materno-fetal é caracterizada pelo acometimento de fêmeas gestantes, causando nascimento de natimortos ou de crias fracas, e principalmente abortos no último trimestre gestacional (Anderson, 2007; Low e Donachie, 1997).

A listeriose tem distintas manifestações clínicas descritas em seres humanos. Indivíduos imunocompetentes apresentam febre e gastroenterite autolimitante; em pacientes imunossuprimidos e idosos é comum observar sinais neurológicos (listeriose neurológica); em recém-nascidos observa-se a forma séptica da doença; enquanto em mulheres gestantes, a listeriose pode causar aborto e nascimento de natimortos (listeriose materno-fetal) (Abram et al., 2002).

A ocorrência da doença em seres humanos é de notificação obrigatória em alguns países que já sofreram surtos de listeriose como Estados Unidos da América (EUA), Canadá, África do Sul e países do continente Europeu. No Brasil, mesmo havendo relatos da doença (De Sá et al., 2004; Toyoshima et al., 2006), não há controle epidemiológico da listeriose humana. A falta de controle epidemiológico e diagnóstico da doença também é observada nos animais, mesmo com a existência de relatos de listeriose em rebanhos bovinos, ovinos e caprinos de

diversas partes do mundo, incluindo o Brasil (Schroeder e van Rensburg, 1993; Headley et al., 2014; Wiedmann et al., 1997; Malik et al. 2002; Fairley e Colson 2013; Rocha et al., 2013 Ribeiro et al., 2006; Sanches et al., 2000; Headley et al., 2014; Rissi et al., 2010).

Uma das estratégias de maior sucesso e custo-benefício quando se trata de controle e prevenção de doenças infecciosas é a vacinação (Gentschev et al., 2001; Calderón-González et al., 2014). Atualmente, não existem vacinas comerciais disponíveis destinadas ao uso humano ou animal contra a infecção por *L. monocytogenes*. Vacinas contendo bactérias inativadas são seguras e podem estimular fortemente a resposta imune humoral. Entretanto, quando se trata da eliminação de patógenos bacterianos intracelulares, a resposta imune celular com estimulação de linfócitos T de memória é fundamental para causar a morte da célula infectada (Gentschev et al., 2001; Griffiths e Khader, 2014). Vacinas indutoras de células T direcionam os antígenos para as células apresentadoras de antígenos (APCs), que transformam os antígenos em peptídeos, para serem apresentados na superfície celular às células T, via complexo de histocompatibilidade (MHC) (Zenewicz e Shen, 2007).

Cepas atenuadas de *L. monocytogenes* por deleção de genes de virulência como *actA* ou *prfA* ou *hly* experimentalmente testadas como vacina viva promoveram imunidade duradoura, mas foram capazes de multiplicar no baço e fígado (Goossens e Milon, 1992; Gahan e Collins, 1995), e ainda provocaram mortalidade de camundongos vacinados (Lauer et al., 2008). Uma estratégia opcional é de usar microrganismos vivos não patogênicos como vetores vacinais contra listeriose. Um estudo utilizou *Lactococcus lactis* expressando constitutivamente o gene *hly* de *L. monocytogenes*. Embora a vacinação tenha promovido menor recuperação bacteriana no baço de camundongos vacinados e desafiados, a proteção só ocorreu após aplicação de mais de uma dose vacinal (Bahey-El-Din et al., 2010).

Estudos vacinais mais recentes contra listeriose em modelo murino avaliam o potencial de proteínas imunogênicas produzidas por *L. monocytogenes* como listeriolisina O, proteína indutora de montagem de actina, desidrogenase gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, associadas à imunoestimulantes na indução resposta imune protetora (Masato et al., 2012; Calderón-gonzález et al., 2014; Calderón-gonzález et al., 2015; Calderón-gonzález et al., 2016). Essas proteínas imunogênicas atuam favorecendo a patogenicidade bacteriana no meio intracelular e incitam as células do hospedeiro na construção de uma resposta imune contra o patógeno (Darji et al., 1998; Carrero et al., 2012; Calderón-gonzález et al., 2014).

Entre os adjuvantes mais utilizados associados às proteínas e/ou peptídeos imunogênicos estão os oligodesoxinucleotídeos (CpG) e glico-nanopartículas de ouro (GNP) (Ito et al.,

2004, Rio et al., 2015; Calderon-Gonzalez et al., 2017). CpG são pequenas moléculas de DNA sintético de cadeia simples de citosina e guanina, com sequências consideradas padrões moleculares associados aos patógenos (PAMPs) que ativam a produção de citocinas e favorece a resposta de linfócito tipo T *helper* 1 (Th1) ao antígeno utilizado, aumentando o número de células T CD8⁺ produtoras de interferon (Bode et al., 2011). GNP são nanopartículas estáveis, altamente versáteis, hidrossolúveis, com boa biocompatibilidade, resistência à degradação enzimática, de fácil preparação e capacidade de incorporar a diferentes ligantes (Rio et al., 2015; Calderon-Gonzalez et al., 2017). Contudo, essas construções são de difícil aplicabilidade devido à falta de pesquisas quanto à proteção aos sinais clínicos da doença e devido ao elevado custo desses adjuvantes. Calderon-Gonzalez e colaboradores (2015), avaliaram células dendríticas (CD) como vetores vacinais, associados a peptídeos de proteínas imunogênicas de *Listeria*, adicionado ao adjuvante Advaxtm, indutor de resposta de células T. Apenas com uma dose, a vacina foi capaz de reduzir a carga bacteriana de baço em camundongos vacinados e desafiados por *L. monocytogenes*, com produção de interferon- γ por células TCD8⁺, mas trata-se de uma metodologia difícil de ser implantada e também onerosa.

Janzani e colaboradores (2010) demonstraram resultados animadores com vacina inativada de *L. monocytogenes*. A associação de *L. monocytogenes* inativada pelo calor ao adjuvante naloxone, antagonista opióide de ação imunomoduladora, demonstrou ser capaz de induzir proteção, com redução da carga bacteriana em baço e fígado de animais vacinados com redução de mortalidade (Jazani et al., 2010). Estes resultados contrariam trabalhos com vacinas inativadas pelo calor de não induzirem proteção após desafio (Von Koenig et al., 1982; Lauvau et al., 2001). Contudo, naloxone apesar de ter demonstrado ser um ótimo adjuvante vacinal associado à bactéria morta pelo calor, trata-se de um fármaco caro e de difícil acesso.

Outras formas de inativação de *L. monocytogenes* como por irradiação Gamma (Datta et al., 2006) ou fotoquimicamente (Lauer et al., 2008) parecem ser capazes de gerar cepas imunogênicas indutoras de resposta imune celular protetora (Datta et al., 2006; Lauer et al., 2008). Entretanto, o efeito protetor destas vacinas inativadas contra a manifestação da doença, ou seja, reduzindo lesões e sintomas clínicos de listeriose não foi avaliado.

Considerando as vantagens relacionadas à segurança das vacinas inativadas, este trabalho tem como objetivo principal avaliar o potencial de proteção e de imunogenicidade em modelo murino de duas vacinas, uma constituída de *L. monocytogenes* inativada por irradiação

Gamma associada ao alginato, ou alginato com quitosana, e outra constituída de proteína quimérica recombinante, construída por predição *in silico*, a partir de epítomos imunogênicos de *L. monocytogenes*.

O capítulo I deste trabalho irá abordar uma revisão de literatura sobre resposta imune frente à listeriose e os estudos de vacinas descritos na literatura até o momento. O capítulo II irá apresentar os resultados do trabalho realizado com *L. monocytogenes* Gamma irradiada como vacina. O capítulo III refere-se a construção de uma proteína quimérica constituída de epítomos preditos de *L. monocytogenes* com potencial vacinal contra listeriose em modelo murino.

CAPÍTULO I

REVISÃO DE LITERATURA

1. A listeriose humana

A infecção por *L. monocytogenes* é um problema de saúde pública por causar doença grave e prejudicar a saúde humana. Entre as principais fontes de contaminação humana estão à ingestão de leite não pasteurizado, carne crua, frutos do mar e cachorro-quente (Gillespie et al., 2010; Cartwright et al., 2013; Schlech, 2019). Devido ao controle regulatório de patógenos em produtos de origem animal, surtos provenientes do consumo de carne vermelha e aves são menores (Gottlieb et al., 2006; Cartwright et al., 2013; Buchanan et al., 2017). Entretanto, notificações de surtos envolvendo alimentos anteriormente considerados de baixo risco de contaminação como sorvete (Pouillot et al., 2016; Ottesen et al., 2016), verduras e frutas (Gaul et al., 2013; McCollum et al., 2013; Angelo et al., 2017) têm sido relatados.

Gastroenterite, febre, diarreia, artromialgia, dor abdominal, dor de cabeça e náusea são sintomas clínicos relacionados à infecção por listeriose (Mylonakis et al., 1998; Ooi e Lorber, 2005; Mehmood et al., 2017; Schlech, 2019). A bactéria também pode causar dermatite, endocardite, pericardite, pneumonia, peritonite, hepatite e endoftalmite (Garcia-Montero et al., 1995; Revathi et al., 1995; Jayaraj et al., 1998; Vargas et al., 1998; Mereghetti et al., 1998; Jackson et al., 2003; Kida et al., 2007).

O comportamento invasivo de *L. monocytogenes* em pacientes com baixa imunidade e imunossupressão pode ocasionar doença neurológica grave, sepse e morte (Swaminathan e Gerner-Smidt, 2007; Drevets e Bronze, 2008). O período de incubação da listeriose é variável, principalmente quando há envolvimento de cepas mais invasivas de *L. monocytogenes* (Goulet et al., 2013). Nos casos de gastroenterite e bacteremia os sintomas aparecem em torno de 24 e 48 horas após infecção (Goulet et al., 2013). Demais sintomas, incluindo sinais neurológicos ocorrem entre 8º e 9º dia (Teixeira et al., 2011; Goulet et al., 2013; Mehmood et al., 2017). Enquanto, na listeriose materno-fetal, o período de incubação é maior, ocorrendo aproximadamente no 27º dia, após infecção (Goulet et al., 2013).

Meningite e meningoencefalite são alterações geralmente observadas no sistema nervoso central, provocada pela bacteremia de *L. monocytogenes* (Vazquez-Boland et al., 2001). Abscessos no cerebelo com lesão no tronco cerebral são menos comuns (Mylonakis et al., 1998).

Mulheres gestantes podem ser assintomáticas, apresentando parto prematuro, aborto e natimorto, ou ter sintomas semelhantes à gripe, febre e dores nas costas (Mylonakis et al., 2002; Lamont et al., 2011; Teixeira et al., 2011), tornando o diagnóstico de listeriose na gestante difícil. A infecção fetal pode acontecer via hematogena, via colonização ascendente do canal do parto e através da ingestão ou aspiração do conteúdo amniótico (Becroft et al., 1971; Lennon et al., 1984).

Infecção gestacional pode resultar em corioamnionite com formação de múltiplos granulomas, caracterizado por focos necróticos associados a infiltrado neutrofílico entre trofoblastos e estroma viloso placentário (Lallemant et al., 1992). Erupções cutâneas e granulomas em baço e fígado de bebês infectados caracterizam a síndrome granulomatosa infantil-séptica (*granulomatosis infantiseptica*) (Potel, 1952; Lallemant et al., 1992). Entre o nascimento até a terceira semana de vida, bebês sobreviventes à síndrome granulomatosa podem desenvolver meningite com sinais neurológicos e morte, conseqüentemente (Teixeira et al., 2011).

2. Listeriose em animais

Várias espécies de animais podem ser acometidas pela listeriose, incluindo: pássaros, peixes, crustáceos, ovelhas, cabras, bovinos, cavalos, porcos, camelos, caninos e roedores (Low e Donachie 1997; Gray e Killinger, 1966; Akanbi et al., 2008; *Center for food security Public health – CFSPH*, 2019). Muitas vezes a infecção ocorre de maneira subclínica, mas entre as apresentações clínicas da doença, são observados: septicemia em animais novos, doença reprodutiva associada a metrite, placentite e aborto (principalmente em ovelhas e vacas) e doença neurológica (meningoencefalite, rombencefalite) em ovelhas, cabras e bovinos (Malik et al., 2002). A listeriose em ruminantes pode provocar repetição de cio, endometriose (Malik et al., 2002), mielite espinhal, uveíte, ceratoconjuntivite, endocardite e mastite (Malik et al., 2002; Nightingale et al., 2004; Rawool et al. 2007; Headley et al. 2014), gastroenterite, hepatite e pneumonia. Embora a lesão neurológica e infecção uterina sejam as formas mais importantes da doença (Nightingale et al., 2004).

A listeriose em ruminantes é adquirida através da ingestão de alimentos contaminados, principalmente por ingestão de silagem. Dessa forma, são propostas duas possíveis patogêneses da doença neurológica, sendo: a primeira, pelo alcance direto de *L. monocytogenes* aos nervos da cavidade oral, por ingestão de alimentos abrasivos; A segunda, por via hematogena, atravessando a barreira hematoencefálica (Roberts e Wiedmann, 2002).

A listeriose neurológica em pequenos ruminantes é chamada de “*circle disease*”, devido à movimentação em círculos em única direção do animal doente (Dhama et al., 2015). Entre outros sinais da doença incluem: anorexia, depressão, redução da produção de leite, febre, incordenação, salivação intensa e paralisia facial unilateral (Nightingale et al., 2004). O período de incubação da doença varia entre 2-3 semanas, com desenvolvimento dos sinais clínicos em torno de 1-4 dias (Roberts e Wiedmann, 2002). Achados macroscópicos como congestão meningeal e de tronco cerebral variam de discreta a intensa (Headley et al., 2014). Na histopatologia do cérebro, a identificação de rombencefalite normalmente é unilateral, acometendo ponte e medula oblonga (Brugère-Picoux, 2008). Formação de microabscessos e manguito perivascular no tronco cerebral com presença de neutrófilos e macrófagos são achados comuns (Oevermann et al., 2010b). Nos casos envolvendo septicemia por listeriose, necrose de baço e fígado são comuns (Brugère-Picoux, 2008).

A infecção uterina em ruminantes é caracterizada por abortos ao final da gestação ou septicemia em neonatos (Nightingale et al., 2004). A bactéria *L. monocytogenes* depois de ingerida, invade a barreira intestinal, alcança a via sanguínea e atravessa a barreira fetoplacentária. O período de incubação é mais curto e com apenas um dia após a infecção os animais podem apresentar febre, depressão, anorexia e redução da produção de leite e diarreia (Low e Donachie, 1997). Placentite, endometrite e necrose são achados típicos associados a abortos por listeriose (Brugère-Picoux, 2008; Hoelzer et al., 2012).

Ocasionalmente a listeriose provoca sepse em cavalos, suínos e aves domésticas, incluindo encefalite localizada em aves domésticas. Embora, pássaros adultos raramente são infectados (Dhama et al., 2015). Roedores podem ser afetados com *L. monocytogenes*, mas são mais relevantes como fonte de disseminação bacteriana no meio ambiente (Wang et al., 2017).

3. Epidemiologia da listeriose

L. monocytogenes é reconhecida como patógeno de origem alimentar desde 1980 (Schlech et al., 1983). Trata-se de uma bactéria de difícil controle, pois são resistentes a baixas temperaturas (Vázquez-Boland et al., 2001; Allerberger, 2003), altas concentrações de sal e baixo pH (Vázquez-Boland et al., 2001). As fontes de contaminação humana incluem o consumo de carnes e peixes crus, leite (não pasteurizado), vegetais, frutas, alimentos processados como patês, salsichas, queijos e sorvetes (Vázquez-Boland et al., 2001; Gillespie et al., 2010; Cartwright et al., 2013; Schlech, 2019;).

L. monocytogenes é classificada em quatro linhagens evolutivas (I, II, III e IV) (Orsi et al., 2011) possuindo uma variedade de sorotipos por combinação de antígenos somáticos e flagelares, resultando em 13 sorotipos descritos (Borucki e Call, 2003). A maioria das cepas de origem alimentar que causam infecções humanas pertence aos sorotipos 4b, 1/2b (linhagem I), 1/2a e 1/2c (linhagem II), sendo o sorotipo 4b também o mais associado a casos clínicos envolvendo ruminantes (Nightingale et al., 2004; Orsi et al., 2011; Rocha et al., 2013).

A listeriose no Brasil não pertence à lista de doenças de notificação compulsória (Ministério da Saúde, 2017). É considerada uma doença esporádica, com poucos dados epidemiológicos, apesar de haver relatos da doença (Suassuna et al., 1969; Hofer e Menezes, 1969; Esper et al., 1978; Landgraf et al., 1999; Hofer et al., 1999; Schwab e Edelweiss, 2003; De Sá et al., 2004; Toyoshima et al., 2006). Na legislação brasileira, o controle de *L. monocytogenes* nos alimentos, fiscalizado pelo Ministério da Agricultura, passou a ser instituído em produtos de origem animal prontos para consumo (produtos cárneos, lácteos e pescado) (Instrução Normativa N° 9, 2009). No varejo, a fiscalização é realizada pela vigilância Sanitária, entretanto o controle da presença bacteriana envolve apenas queijos, sem qualquer controle nos demais produtos processados e industrializados (Resolução/RDC nº 12, 2001).

Nos EUA a notificação da doença humana é realizada desde 1998 (Jackson et al., 2018), sendo considerado surto alimentar quando acima de duas pessoas adoecem por ingestão do mesmo produto contaminado. De acordo com *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) dos EUA, estima-se que ocorram anualmente 1.600 casos de listeriose, alcançando uma taxa de letalidade de 20% até 30% dos hospitalizados (Choi et al., 2018).

Casos humanos de listeriose são reportados em vários continentes, incluindo África, Oceania, América do Sul, América do Norte, Europa e Ásia (Orsi e Wiedmann, 2016). Noordhout e colaboradores (2014) realizaram um estudo de metanálise avaliando surtos provocados por listeriose em todo o mundo dos anos de 1990 a 2012. Considerando apenas o ano de 2010, cerca de 23.150 pessoas adoeceram por listeriose e a doença foi responsável pela morte de 5.463 pessoas, sendo os idosos acima de 65 anos, os mais acometidos. Contudo, a doença afetou todas as faixas etárias e todas as infecções perinatais resultaram em morte neonatal.

Entre os anos de 2012 a 2016 a infecção por *L. monocytogenes* no continente Europeu alcançou cerca de 2.000 casos por ano, de acordo com o *European Centre for Disease Prevention and Control* (ECDC, 2017). Nota-se o aumento da casuística da doença em países

da Europa como Áustria, Dinamarca, Hungria, Espanha, Suécia e, principalmente, França e Itália desde o ano de 2006 em relação aos anos anteriores (Goulet et al., 2008; Pontello et al., 2012).

A África do Sul sofre com o maior surto de listeriose humana conhecido em todos os tempos, com 1.019 casos confirmados em laboratório (Allam et al., 2018) causando a morte de pelo menos 200 pessoas desde janeiro de 2017 a março de 2018 (*National Institute for Communicable Disease/NICD*, 2018). Somente após o surto, em dezembro de 2017, a listeriose passou a ser considerada de notificação obrigatória na África do Sul (*World Health Organization South Africa*, 2017).

A listeriose por *L. monocytogenes* em ruminantes é principalmente descrita em países de clima temperado e menos comum em áreas tropicais e subtropicais (Laureyns et al., 2008). Entretanto, existem relatos da doença em animais em diversos países e, nos mesmos continentes onde são descritos surtos humanos (Schroeder e van Rensburg, 1993; Headley et al., 2014; Wiedmann et al., 1997; Malik et al. 2002; Fairley e Colson 2013; Rocha et al., 2013). Os ovinos são os mais acometidos pela doença, seguido por caprinos e bovinos (Low e Donachie, 1997). No Brasil, há relatos de listeriose em bovinos (Sanches et al., 2000; Galiza et al., 2010; Headley et al., 2014), ovinos (Mendes et al. 2005, Ribeiro et al. 2006, Guedes et al. 2007; Rissi, et al 2010) e caprinos (Rissi et al. 2006, Guedes et al. 2007) com pouco diagnóstico de listeriose causando aborto (Silva et al., 2009). Mas não existe nenhum levantamento específico da doença em ruminantes no Brasil.

4. Patogênese e resposta imune contra a infecção

4.1 Resposta imune inata

L. monocytogenes é um patógeno intracelular com a capacidade de invadir células apresentadoras de antígenos e células epiteliais, sem precisar ter acesso ao meio extracelular (Vázquez-Boland *et al.*, 2001; Poulsen e Czuprynski, 2013). A invasão acontece após a ingestão do alimento contaminado, a bactéria presente no trato gastrointestinal, infecta as células epiteliais através da interação da proteína bacteriana internalina A (InlA) e receptores E-caderina expressos em enterócitos (Lecuit et al., 2001) invadindo o epitélio intestinal e colonizando placa de Payer, via células M (Vazquez-Boland et al., 2001). A bactéria alcança a corrente sanguínea, fígado e inicia a expressão de outra proteína, a internalina B (InlB) que se liga aos receptores de fator de crescimento de hepatócitos (Met tirosina kinase) (Niemann et al., 2007). Uma vez dentro da célula a bactéria permanece dentro de um fagossomo, no qual

secreta fatores de virulência, listeriolisina O (LLO) e fosfolipases C (PlcA e PlcB) que permitem a formação de poros e ruptura da membrana fagossomal (Hamon et al., 2006; Lam et al., 2011; Poulsen e Czuprynski, 2013). A bactéria livre no citoplasma multiplica e inicia polimerização dos filamentos de actina intracelular a seu favor, através da expressão da proteína indutora de actina (ActA), a polimerização propulsiona a bactéria em direção a periferia da membrana citoplasmática (“cauda de cometa”) com força suficiente para atravessá-la e acessar o citoplasma da célula vizinha (Pamer, 2004; Travier et al., 2013).

No fígado e no baço, *L. monocytogenes* é rapidamente internalizada por macrófagos residentes que tentam controlar o crescimento e a disseminação bacteriana através da secreção do fator de necrose tumoral (TNF- α) e interleucina 12 (IL-12) (Tripp et al., 1993). Estas duas citocinas estimulam células natural Killers (NK) a produzir interferon gamma (IFN- γ) que atuarão aumentando a atividade e a ação bactericida dos macrófagos através da geração de intermediários reativos de oxigênio e nitrogênio (Schoenborn e Wilson, 2007; Dussurget et al., 2014). Interferência na produção do IFN- γ aumenta a susceptibilidade a infecção por *Listeria* sp., com maior recuperação bacteriana nos órgãos e morte por listeriose em modelo murino (Dunn e North, 1991; Harty e Bevan, 1995; Andersson et al., 1998; D'Orazio et al., 2006). Contudo, camundongos deficientes em IFN- γ vacinados com *L. monocytogenes* atenuada (deficiente em *Acta*) e desafiados com cepa virulenta de *L. monocytogenes* são capazes de sobreviver à infecção por indução de imunidade dependente de células T CD8⁺ (Harty e Bevan, 1995).

Os neutrófilos rapidamente são recrutados para controle inicial do crescimento bacteriano, por ação da interleucina 6 (IL-6), no local da infecção (Dalrymple et al., 1995). Essas células interiorizam as bactérias, gerando também intermediários reativos de nitrogênio e oxigênio que auxiliam na eliminação bacteriana e secreção de quimiocinas para macrófagos: fator estimulador de colônia- 1 (CSF-1) e quimiocinas quimioatrativas para macrófagos (MCP-1) (Guleria e Pollard, 2001; Zenewicz e Shen, 2007).

A ativação do sistema imune envolve mecanismos de reconhecimento de moléculas bacterianas através dos receptores de superfície do tipo Toll (TLR) expressos em vários tipos celulares como macrófagos, células dendríticas, linfócitos B e T, células epiteliais e mastócitos (Torres et al., 2004). Os receptores TLR2 ligam-se aos peptidoglicanos, ácido lipoteicoico e lipoproteínas de microrganismos e possuem um papel importante na proteção da infecção por *L. monocytogenes* (Torres et al., 2004). Camundongos deficientes de TLR2 são susceptíveis a listeriose, com redução da sobrevivência, maior carga bacteriana e lesões nos

órgãos (Torres et al., 2004; Tripp et al., 1993). Após a ligação molécula e receptor, ocorre ativação de moléculas adaptadoras, denominadas de fator de diferenciação mielóide 88 (MyD88) que transmitem sinais para ativação do fator de transcrição nuclear κ B (NF- κ B) dar início a expressão de vários genes envolvidos na resposta imune inata, e conseqüentemente, produção de citocinas pró-inflamatórias no combate da infecção (Pamer, 2004). Camundongos deficientes de MyD88 também são mais susceptíveis a infecção por *Listeria* com redução da produção de citocinas pró-inflamatórias (Edelson e Unanue, 2002).

As bactérias que alcançam o citoplasma de macrófagos estimulam o reconhecimento molecular através de receptores do tipo NOD (NLRs) que ativam caspase-1 para a produção de citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e IL-18 (Warren et al., 2008). A ausência da caspase-1 em camundongos *Knockouts* infectados com *L. monocytogenes* reduz a produção de citocinas inflamatórias IL-18 e IFN- γ impedindo a erradicação da infecção bacteriana com mortalidade desses animais aos sete dias após a infecção (Tsuji et al., 2004).

4.2 Resposta imune adaptativa

L. monocytogenes quando presente no citoplasma da célula do hospedeiro produz fatores de virulência essenciais para a sua sobrevivência e altamente capazes de incitar a resposta imune celular do hospedeiro (Pilgrim et al., 2003). A LLO e a proteína p60 são alguns desses fatores de virulência importante para a sobrevivência bacteriana e sucesso de infecção. *L. monocytogenes* deficientes para LLO são rapidamente reconhecidas e eliminadas de camundongos infectados por via endovenosa, com ausência de lesão no baço e fígado desses animais (Gaillard et al., 1986). Mesmo mantendo a bacteremia, a bactéria mutante é incapaz de induzir resposta imune protetora baseada em linfócitos T (Berche et al., 1987), demonstrando a importância da proteína LLO tanto para a bactéria quanto para a indução de resposta imune celular do hospedeiro.

A proteína p60, codificada pelo gene *iap* (proteína associada à invasão), está relacionada à divisão celular bacteriana (Pilgrim et al., 2003). Cepas mutantes de *L. monocytogenes* impedidas de produzir p60 possuem alteração tanto na capacidade de causar doença quanto na sua morfologia, sendo extremamente atenuadas em camundongos infectados (Pilgrim et al., 2003). A proteína p60 possui capacidade de induzir proliferação de linfócitos T CD4⁺ sendo considerada uma proteína altamente imunogênica. Camundongos *naive* que receberam linfócitos Th1 específicos contra p60 posteriormente desafiados com *L.*

monocytogenes, possuem menor colonização bacteriana no baço, demonstrando a importância dos linfócitos T CD4⁺ na indução de proteção contra a listeriose (Geginat et al., 1998).

L. monocytogenes é um patógeno intracelular altamente indutor de células T. As células dendríticas (CD) são células apresentadoras de antígenos que expressam constitutivamente o complexo de histocompatibilidade (MHC) essenciais para ativação e expansão clonal de células T CD4⁺ e T CD8⁺ (Kolb-Mäurer et al., 2000). Partes das proteínas bacterianas secretadas no citoplasma de células apresentadoras de antígenos são degradadas por proteossomas. Os peptídeos bacterianos gerados são transportados pelos MHC de classe I para serem apresentados aos linfócitos T CD8⁺ citotóxicos que eliminarão células infectadas. Já os produtos bacterianos gerados por fagocitose são transportados pelas moléculas MHC de classe II para serem apresentados aos linfócitos T CD4⁺ auxiliares. Estas células se diferenciam em células Th1 efectoras para produção de citocinas pró-inflamatórias, principalmente IFN- γ , (Pamer, 2004). São os linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ responsáveis pelo controle da infecção e reinfecção por *L. monocytogenes* (Harty e Bevan, 1995; Geginat et al., 1998; Bruhn et al., 2007).

L. monocytogenes possui capacidade de disseminar via célula a célula sem entrar em contato com o meio extracelular ficando protegida dos efeitos antibacterianos humorais. O controle da infecção bacteriana é realizado principalmente pelos linfócitos T CD8⁺ capazes de eliminar células infectadas com *L. monocytogenes* (Goossens e Milon, 1992). O papel dos linfócitos T CD4⁺ na infecção por *L. monocytogenes* está na capacidade de influenciar na geração e sobrevivência de células T CD8⁺ efectora (Marzo et al., 2004; Romagnoli et al., 2017). Camundongos imunizados deficientes em linfócitos T CD4⁺ possuem uma menor resposta de células T CD8⁺ de memória (Marzo et al., 2004), demonstrando a importância da ação conjunta dos linfócitos T CD8⁺ e T CD4⁺ durante a infecção por *L. monocytogenes*.

5. Desenvolvimento vacinal contra *L. monocytogenes*

Embora a listeriose seja uma doença de origem alimentar de grande importância na saúde pública e animal, não existe vacinas comerciais contra listeriose humana ou listeriose animal. Por ser uma doença esporádica o interesse no desenvolvimento vacinal é limitado, contudo, o crescente aumento de surtos da doença no mundo (Goulet et al., 2008; Pontello et al., 2012) e o envelhecimento populacional faz com que o desenvolvimento de vacinas protetivas e seguras aos grupos de risco uma estratégia desejável.

Vacinas contra patógenos intracelulares como *L. monocytogenes* necessitam induzir uma boa resposta imune celular (Griffiths e Khader, 2014). A primo-vacinação com *L. monocytogenes* utilizando baixas doses (2×10^3 *L. monocytogenes*) (Busch e Pamer, 1999) foi inicialmente estudada em camundongos (Koga et al., 1987; Baldrige et al., 1990). Esse estímulo inicial, foi capaz de aumentar de forma eficiente células T CD8⁺ específicas aos cinco dias após a reinfecção (1×10^5 bactérias) onde o pico celular é detectado, resultando na resolução da infecção aos dois dias após pico celular (Busch e Pamer, 1999). Por maior que seja a capacidade de induzir resposta imune celular efetora, vacinas vivas de *L. monocytogenes* contra listeriose, mesmo sendo atenuada por deleção de genes de virulência, não é desejável, por não serem consideradas seguras (Goossens e Milon, 1992; Busch e Pamer, 1999). Por outro lado, embora vacinas mortas inativadas sejam seguras, são pouco imunogênicas, com baixa capacidade protetiva (Von Koenig et al., 1982) necessitando de doses reforço para manter uma efetiva resposta imune (Datta et al., 2006., Lauer et al., 2008).

Algumas estratégias têm sido sugeridas na construção de vacinas contra listeriose. Trabalhos avaliam vacinas constituídas de subunidades (Ito et al., 2004) associadas a adjuvantes (Calderon-Gonzalez et al., 2015; Calderon-Gonzalez et al., 2016) ou associada a células (Kono et al., 2012; Carrasco-Marín et al., 2012; Calderon-Gonzalez, 2014; Calderon-Gonzalez, 2015), vacinas contendo microorganismos vetoriais não patogênicos ou atenuados transportando peptídeos imunogênicos de *Listeria* selecionados através da bioinformática (Hess et al., 1996; Bahey-El-Din et al., 2010; Mohamed et al., 2012). Entre as principais falhas no desenvolvimento dessas vacinas, podemos citar: utilização de vias de aplicação não usuais (via endovenosa e intraperitoneal); a necessidade de realizar várias doses de reforço; complexidade (envolvendo células) e onerosidade da construção vacinal; falha dos adjuvantes em melhorar resposta vacinal e ausência de estudos que avaliem redução dos sintomas da doença. Contudo, essas pesquisas incentivam a busca de estratégias de vacinação envolvendo vacinas recombinantes.

A seleção *in silico* de peptídeos sabidamente imunogênicos de patógenos intracelulares como *L. monocytogenes*, tem como objetivo melhorar a apresentação desses antígenos pelas células dendríticas, através das moléculas de MHC I e MHC II, para as células T como alternativa vacinal (Geginat et al., 2001; Skoberne e Geginat, 2002). As proteínas LLO e desidrogenase gliceraldeído-3-fosfato (GAPDH) de *L. monocytogenes* são consideradas imunogênicas e capazes de estimular a resposta de células T CD4⁺ e T CD8⁺ (Alvarez-Dominguez et al., 2008). Entretanto, a apresentação desses peptídeos não é

suficiente para conferir real proteção contra listeriose (Calderon-Gonzalez et al., 2015), necessitando da associação desses peptídeos a adjuvantes (Calderon-Gonzalez et al., 2015; Calderon-Gonzalez et al., 2016).

A maior parte dos estudos envolvidos na prevenção da listeriose foi desenvolvida em modelo murino (sumarizado na Tabela 1), utilizando avaliação *in vitro* da resposta imune celular, recuperação bacteriana no baço e fígado e, avaliando sobrevivência. Nos estudos envolvendo modelos de listeriose materno-fetal em camundongos grávidos, a vacina foi avaliada quanto ao aborto (Ito et al., 2004), tamanho de ninhada (Ito et al., 2004; Calderon-Gonzalez et al., 2017), habilidade de locomoção, desenvolvimento de pelagem e contagem bacteriana (Calderon-Gonzalez et al., 2016; Calderon-Gonzalez et al., 2017). É relevante verificar se as vacinas reduzem a sintomatologia, incluindo os sinais de infecção materno-fetal. Mesmo embora estudos envolvendo CpG e GNP sejam interessantes, é importante refletir quanto a aplicabilidade das vias de administração desses adjuvantes (endovenosa e intraperitoneal).

Tabela 1 – Estudos de vacinas contra listeriose em modelo murino.

Antígeno vacinal	Adjuvante vacinal	via vacinal	dose vacinal	n° doses	camundongo linhagem	cepa desafio	via desafio	dose desafio	Referência
HKLM	-	i.p. ou s.c	1 x 10 ⁸	1	C3H/HE	<i>Listeria</i> EGD 1/2a	i.v.	1 x 10 ⁵	Koga et al., 1987
<i>Listeria</i> viva	-	i.p. ou s.c	2 x 10 ³	1	C3H/HE	<i>Listeria</i> EGD 1/2a	i.v.	1 x 10 ⁵	Koga et al., 1987
<i>Listeria</i> viva	-	i.v.	4,5 x 10 ²	1	Balb/c	<i>Listeria</i> 10403 1/2a	i.v.	4,5 x 10 ⁴	Baldrige et al., 1990
<i>Listeria</i> deleção gene <i>Acta</i>	-	i.v. ou i.m.	1,5 x 10 ⁷	1	C3H	<i>Listeria</i> LO28 1/2c	i.v.	9,2 x 10 ⁴	Goossens e Milon, 1992
<i>Listeria</i> deleção gene <i>hly</i>	-	i.p.	1 x 10 ⁵	1	Balb/c	<i>Listeria</i> LO28 1/2c	i.p.	5 x 10 ⁷	Gahan e Collins, 1995
HKLM	IL-12	i.p.	1 x 10 ⁹	2	C3HeB/FeJ	<i>Listeria</i>	i.p.	5 x 10 ⁵	Miller et al., 1996
<i>S. typhimurium</i> expressão de genes <i>p60</i> e <i>Hly</i>	-	v.o	5 x 10 ⁵	3	C57BL/6	<i>Listeria</i> EGD 1/2a	i.v.	1 x 10 ⁶	Hess et al., 1996
LLO e p60	CpG	i.d.	-	2	Balb/c	<i>Listeria</i> EGD 1/2a	i.v.	1 x 10 ⁴	Joachim Fensterle, 1999
Epítomos LLO	CpG	i.p.	-	1	Balb/c gravídico	<i>Listeria</i> EGD 1/2a	i.p.	5 x 10 ⁶	Ito et al., 2004
<i>Listeria</i> viva	-	i.p.	1 x 10 ⁴	1	C57BL/6	<i>Listeria</i> 10403s	i.p.	2 x 10 ⁶	Datta et al., 2006
<i>Listeria</i> Gamma irradiada	-	s.c.	1 x 10 ⁹	2	C57BL/6	<i>Listeria</i> 10403s 1/2a	i.p.	2 x 10 ⁶	Datta et al., 2006
KBMA	-	i.v. ou i.m.	1 x 10 ⁸	1	BALB/c	<i>Listeria</i> 10403s 1/2a	i.v.	2 x 10 ⁵	Lauer et al., 2008
<i>Listeria</i> <i>prfA</i> ou KBMA	-	i.v. ou i.m.	5 x 10 ⁶	1 ou 2	C57BL/6	<i>Listeria</i> 10403s 1/2a	i.v.	2 x 10 ⁵	Lauer et al., 2008
<i>L. lactis</i> expressando LLO e p60	-	i.p.	1 x 10 ⁷	3	Balb/c	<i>Listeria</i> EGDe 1/2a	i.p.	4 x 10 ⁵	Bahey-El-Din et al., 2010
<i>L. lactis</i> expressando LLO e p60	-	v.o.	5 x 10 ⁹	7	Balb/c	<i>Listeria</i> EGDm 1/2a	v.o.	6 x 10 ⁹	Bahey-El-Din et al., 2010

Tabela 1 – Estudos de vacinas contra listeriose em modelo murino.

Antígeno vacinal	Adjuvante vacinal	via vacinal	dose vacinal	n° doses	camundongo linhagem	cepa desafio	via desafio	dose desafio	Referência
HKLM	-	s.c.	3 x 10 ⁶	2	Balb/c	<i>Listeria</i> 1298 4b	i.p.	1 x 10 ⁵	Jazani et al., 2010
<i>L. innocua</i> inserção <i>vgc</i>	-	i.v.	1 x 10 ⁷	1	Balb/c	<i>Listeria</i> EGDe 1/2a	i.v.	2 x 10 ⁶	Mohamed et al., 2012
<i>Listeria</i> viva	-	i.v.	1 x 10 ³	1	Balb/c	<i>Listeria</i> EGDe 1/2a	i.v.	2 x 10 ⁶	Mohamed et al., 2012
vacina peptídeo (LLO) - células dendríticas	-	i.v.	-	2	Balb/c	<i>Listeria</i> EGD 1/2a	i.v.	1 x 10 ⁴	Kono et al., 2012
vacina peptídeo (LLO) - células dendríticas	-	i.v.	-	2	Balb/c	<i>Listeria</i> EGD 1/2a	i.v.	5 x 10 ⁴	Kono et al., 2012
vacina peptídeo (LLO) constituída de macrófagos (fagossomo)	-	i.p.	-	1	CBA/J	<i>Listeria</i> 10403 1/2a	i.p.	1 x 10 ³ - 3 dias consecutivos	Carrasco-Marín et al., 2012
vacina peptídeo (GAPDH) e células dendríticas	-	i.p.	-	7	C57BL/6	<i>Listeria</i> 10403s 1/2a	i.p.	5 x 10 ³ - 3 dias consecutivos	Calderon-Gonzalez, et al., 2014
Advax	Advax	i.p. / i.v.	-	1	C57BL/6	<i>Listeria</i> 10403s 1/2a	i.p. / i.v.	5 x 10 ³	Rio et al., 2015
Peptídeos (GAPDH e LLO) – células dendríticas	Advax	i.p.	-	1	Balb/c e C57BL/6	<i>Listeria</i> 10403s 1/2a	i.p.	1 x 10 ³	Calderon-Gonzalez, 2015
Peptídeos (GAPDH e LLO)	GNP - Advax	i.v.	-	1	C57BL/6 gravídico	<i>Listeria</i> 10403s 1/2a	i.v.	1 x 10 ⁵	Calderón-Gonzalez et al., 2016
TLR 2/4	GNP - GAPDH	i.v.	-	1	C57BL/6 gravídico	<i>Listeria</i> 10403s 1/2a	i.v.	1 x 10 ⁴ CFU/mL por 3 dias consecutivos	Calderón-Gonzalez et al., 2017

Vias de inoculação – (i.p.) intraperitoneal; (i.v.) intravenoso; (s.c.) subcutâneo; (i.d.) intradérmico;

LM – *Listeria monocytogenes*; HKLM – *heat killed Listeria monocytogenes*; KBMA - *killed but metabolically active* (inativação fotoquímica)

GNP – glico-nanopartículas de ouro; CpG – oligodesoxinucleotídeos;

(-) não mencionado no trabalho citado.

5.1. Adjuvantes em vacinas contra listeriose

Adjuvantes são substâncias adicionadas as vacinas com objetivo de aumentar a imunogenicidade de antígenos (Pasquale et al., 2015). Diferentes tipos de adjuvantes já foram testados em modelo de listeriose murino. Incluindo adjuvantes que mimetizam agonistas de TLR (Ito et al., 2004; Calderón-Gonzalez et al., 2017), IL-12 recombinante (Miller et al., 1996), glico-nanopartículas de ouro (GNP) (Calderón-Gonzalez et al., 2016; Calderón-Gonzalez et al., 2017), drogas (naloxone) (Jazani et al., 2010), oligodesoxinucleotídeos (CpG) (Ito et al., 2004, Rio et al., 2015; Calderon-Gonzalez et al., 2017).

A vacina constituída por *L. monocytogenes* morta pelo calor (HKLM) é incapaz de induzir imunidade celular protetora contra listeriose (Von Koenig et al., 1982; Miller et al., 1996), mesmo sendo capaz de aumentar os níveis de IFN- γ (Jazani et al., 2010). Para melhorar essa resposta imunológica, Miller e colaboradores (1996) associaram IL-12 recombinante à HKLM. Nesse estudo, observou-se uma melhor resposta imune mediada por células com ativação de células T, produção de IFN- γ e redução bacteriana no baço e fígado em camundongos desafiados com *L. monocytogenes*. Entretanto, a proteção ocorreu apenas depois de aplicadas várias doses reforços, dificultando sua aplicabilidade.

Jazani et al., 2010, avaliaram o efeito do adjuvante naloxone, um antagonista opióide, que possui efeito de melhorar a resposta celular tipo Th1 associado a HKLM. A vacina induziu aumento produção de IFN- γ em camundongos vacinados e desafiados, com menor carga bacteriana nos órgãos (baço e fígado) melhorando a taxa de sobrevivência de camundongos vacinados desafiados com *L. monocytogenes*, demonstrando que adjuvantes podem melhorar a capacidade protetora de patógenos inativados.

A associação de peptídeos imunogenicos de *Listeria* à gliconanopartícula de ouro (GNP), uma ferramenta multivalente que se assemelham a glicoesfingolípídeos da superfície celular muito utilizado como veículo de substâncias, demonstrou estimular resposta imune celular em camundongos desafiados com *Listeria* (Rio et al., 2015). Resposta semelhante também é observada quando peptídeos imunogênicos de *L. monocytogenes* estão associados à oligodesoxinucleotídeos (CpG), indutores do sistema imune inato através de TLR. Vacinas de subunidades associadas à GNP ou CpG são alternativas vacinais interessantes contra listeriose em modelo murino. Contudo, faltam avaliações quanto à capacidade protetora na infecção letal, manifestação da doença neurológica ou materno fetal. Além disso, o uso destes adjuvantes eleva o custo de produção da vacina.

O advax é um adjuvante polissacarídeo que tem demonstrado ser imunogênico em doenças virais (Layton et al., 2011; Honda-Okubo et al., 2014). Quando avaliado como adjuvante vacinal contra listeriose em camundongos, o índice de proteção foi bom apenas quando foi utilizado associado à GNP, contendo peptídeos de proteínas imunogênicas de *L. monocytogenes* (GAPDH e LLO) (Rio et al., 2015; Calderón-Gonzalez et al., 2016; Calderón-Gonzalez et al., 2016). Tornando possível o uso de vacinas recombinantes no combate a listeriose.

5.2. Vacinas inativadas de *Listeria monocytogenes*

Vacinas mortas inativadas são seguras, contudo são pouco imunogênicas e necessitam de doses reforço para manter uma efetiva resposta imune (Datta et al., 2006). Von Koenig e colaboradores (1982) demonstraram que vacina constituída apenas por *L. monocytogenes* mortas por ação do calor (HKLM) não foi protetora em camundongos desafiados no sétimo dia após a vacina, provocando a morte dos animais em até cinco dias após desafio. A proteção por HKLM foi observada apenas quando associada a citocina IL-12 aplicada via intraperitoneal em camundongos, por estimulação de IFN- γ , células NK e principalmente linfócitos T, mas a proteção só ocorreu após aplicação de duas a três doses reforço (Miller et al., 1996).

É possível identificar em camundongos vacinados com HKLM uma resposta T CD8⁺ de memória, contudo considerada não efetora em camundongos desafiados com *L. monocytogenes* (Lauvau et al., 2001). Provavelmente, porque a resposta imune frente ao estímulo por HKLM fica restrita apenas a fagocitose pelos macrófagos, resultando menor ativação, diferenciação e função efetora de linfócitos T (Pamer, 2004; Lauvau et al., 2001).

Uma alternativa de inativação bacteriana que tem sido explorada é a radiação tanto na forma de ondas (radiação ionizante) ou por partículas elétricas (radiação não ionizante) em vários ramos da indústria, seja alimentícia, na esterilização de materiais, no desenvolvimento de vacinas humanas e animais através da geração de microorganismos atenuados (Huhtanen et al., 1989; Farag et al., 1990; Seo, 2015). Diferentemente dos outros processos de inativação pelo calor ou química, a irradiação preserva estruturas antigênicas da bactéria que normalmente são destruídas pelos outros métodos (Rachmilewitz et al., 2004; Datta et al., 2006).

A vacina constituída por *L. monocytogenes* inativada por irradiação Gamma (KLM- γ) aplicada tanto por via subcutânea (sc) quanto via intraperitoneal (ip) em camundongos

C57BL/6, diferentemente da HKLM, estimula a resposta protetora contra *L. monocytogenes*, através da produção de linfócitos T efetores, e com menor carga bacteriana no baço e fígado e redução da letalidade em infecções letais. Essa resposta por células T de memória foi comprovada pela transferência de linfócitos em camundongos *naive* infectados por *L. monocytogenes* (Datta et al., 2006).

5.3 *Listeria monocytogenes* como vetor vacinal

Inicialmente HKLM foi avaliada com alternativa terapêutica para o controle de alergias alimentares em camundongos e cães e (Li et al., 2003; Frick et al., 2005) e asma em modelo murino (Hansen et al., 2000). Hansen e colaboradores (2000) observaram que com apenas uma aplicação da *L. monocytogenes* morta em camundongos, reverte-se a resposta Th2 provocada pela asma, devido ao estímulo Th1 provado pelo antígeno bacteriano, resultando na diminuição da hiperatividade das vias aéreas, redução da produção de IgE e IL-4, aumentando tanto o número de células T CD8⁺ como também na síntese de IFN- γ e IL-12 (Hansen et al., 2000).

Em consequência, *L. monocytogenes* vem sendo estudado nos últimos anos como vetor vacinal (Ikonomidis et al., 1997; Gunn et al., 2001; Jia et al., 2017; Yin et al., 2017) seu potencial vacinal é devido ao seu ciclo de vida intracelular permitindo maior apresentação de antígenos as células efectoras que controlam a infecção e por induzir uma resposta imune celular forte (Bruhn et al., 2007). Por se tratar de um patógeno responsável por causar mortalidade em indivíduos do grupo de risco (imunossuprimidos, idosos, gestantes e crianças), diferentes mutações no genoma bacteriano têm sido propostas para tornar a bactéria um vetor atenuado, contudo sem alterar a sua imunogenicidade (Brockstedt et al., 2004; Zhao et al., 2005; Lauer et al., 2008; Dowd et al., 2016; Sinha et al., 2017). Entre essas pesquisas, estão estudos de vacina para prevenção da gripe (Ikonomidis et al., 1997), infecção pelo papiloma vírus humano (Gunn et al., 2001), tuberculose (Jia et al., 2017; Yin et al., 2017), e de diferentes cânceres (Brockstedt et al., 2004; Starks et al., 2004; Yang et al., 2014),

A utilização de *L. monocytogenes* atenuada como vetor expressando proteínas recombinantes torna a bactéria facilmente reconhecida pelo sistema imune estimulando eficientemente a resposta imune celular específica contra a doença alvo (Brockstedt et al., 2004). Um exemplo é a deleção dupla de fatores de virulência de *L. monocytogenes* ActA e internalina B ($\Delta actA/\Delta inlB$), pela qual a bactéria fica impedida de invadir as células do hospedeiro, por falha na interação da proteína bacteriana InlB com os receptores celulares Met-C e também de invadir célula a célula por ausência da polimerização de actina do

citoplasma celular (Brockstedt et al., 2004; Lauer et al., 2008). A bactéria atenuada, não causa dano celular e nem a morte das células do hospedeiro (Leimeister-Wächter et al., 1990; Lauer et al., 2008), sendo reconhecida pelas células fagocíticas e eliminada pelo sistema imune inato do hospedeiro por ação de citocinas (IFN- γ , IL-12 e IL-18) e de células T efectoras (Goossens e Milon, 1992; Gahan e Collins, 1995).

A utilização da vacina vetorial de *L. monocytogenes* tem evoluído para fase de testes clínicos em seres humanos gerando boas expectativas (Angelakopoulos et al., 2002). Entretanto, relatos de alterações clínicas em pacientes humanos após aplicação da vacina (Sacco et al., 2016), mantém estudiosos receosos quanto a utilização de *L. monocytogenes* como vetor.

6. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

1. Abram, M.; Schlüter, D.; Vuckovic, D.; Waber, B.; Doric, M.; Deckert, M. Effects of pregnancy-associated *Listeria monocytogenes* infection: necrotizing hepatitis due to impaired maternal immune response and significantly increased abortion rate. *Virchows Arch.*, 2002; 441:368–379.
2. Abram, M.; Schlüter, D.; Vuckovic, D.; Wraber, B.; Doric, M.; Deckert, M. Murine model of pregnancy-associated *Listeria monocytogenes* infection. *FEMS Immunol. Med Microbiol.*, 2003; 35: 177-182.
3. Akanbi, O.B.; Breithaupt, A.; Polster, U.; Alter, T.; Quandt, A.; Bracke, A.; et al. Systemic listeriosis in caged canaries (*Serinus canarius*). *Avian pathology.*, 2008; 37(3): 329-332.
4. Allam, M.; Tau, N.; Smouse, S.L.; Mtshali, P.S.; Mnyameni, F.; Khumalo, Z.T.H.; et al. Whole-genome sequences of *Listeria monocytogenes* sequence type 6 isolates associated with a large foodborne outbreak in South Africa, 2017 to 2018. *Genome Announc.*, 2018.
5. Alvarez-Dominguez C.; Madrazo-Toca, F.; Fernandez-Prieto, L.; Vandekerckhove, J.; Pareja, E.; Tobes, R.; et al. Characterization of a *Listeria monocytogenes* protein interfering with Rab5a. *Traffic.*, 2008; 9: 325–337.
6. Anderson, M. L. Infectious causes of bovine abortion during mid- to late-gestation. *Theriogenology.*, 2007; 68: 474–486.
7. Andersson, A.; Dai, W.J.; Santo, J.P.D.; Brombacher, F. Early IFN- γ Production and Innate Immunity During *Listeria monocytogenes* Infection in the Absence of NK Cells. *J Immunol.*, 1998; 15; 161 (10): 5600-5606.
8. Allerberger, F. *Listeria*: growth, phenotypic differentiation and molecular microbiology. *FEMS Immunol Med Microbiol.*, 2003; 35: 183-189.
9. Angelakopoulos, H.; Loock, K.; Sisul, D.M.; Jensen, E.R.; Miller, J.F.; Hohmann, E.L. Safety and shedding of an attenuated strain of *Listeria monocytogenes* with a deletion of actA/plcB in adult volunteers: a dose escalation study of oral inoculation. *Infect Immun.*, 2002; 70(7):3592–3601.
10. Angelo, K.M.; Conrad, A.R.; Saupe, A.; Dragoo, H.; West, N.; Sorenson A.; et al. Multistate outbreak of *Listeria monocytogenes* infections linked to whole apples used in commercially produced, prepackaged caramel apples: United States, 2014-2015. *Epidemiol Infect.*, 2017; 145:848–856.

11. Bahey-El-Din, M.; Casey, P.G.; Griffin, B.T.; Gahan, CG. Expression of two *Listeria monocytogenes* antigens (P60 and LLO) in *Lactococcus lactis* and examination for use as live vaccine vectors. *J Med Microbiol.*, 2010; 59(8):904-912.
12. Baldridge, J.R.; Barry, R.A.; Hinrichs, D.J. Expression of systemic protection and delayed-type hypersensitivity to *Listeria monocytogenes* is mediated by different T-cell subsets. *Infect Immun.*, 1990; 58:654-658.
13. Becroft, D.M.; Farmer, K.; Seddon, R.J.; Sowden, R.; Stewart, J.H.; Vines, A.; Wattie, D.A. Epidemic listeriosis in the newborn. *British Medical Journal.*, 1971; 3: 747–751.
14. Berche, P.; Gaillard, J.L.; Sansonetti, P.J. Intracellular growth of *Listeria monocytogenes* as a prerequisite for *in vivo* induction of T-cell-mediated immunity. *J Immunol.*, 1987; 138: 2266–2271.
15. Bode, C.; Zhao, G.; Steinhagen, F.; Kinjo, T.; Klinman, D.M. CpG DNA as a vaccine adjuvant. *Expert Rev Vaccines.*, 2011; 10(4):499-511.
16. Bonazzi, M.; Lecuit, M.; Cossart, P. *Listeria monocytogenes* Internalin and E-cadherin: From Bench to Bedside. *Cold Spring Harb Perspect Biol.*, 2009;1.
17. Buchanan, R. L.; Gorris, L. G.; Hayman, M. M.; Jackson, T. C.; Whiting, R. C. A review of *Listeria monocytogenes*: an update on outbreaks, virulence, dose-response, ecology, and risk assessments. *Food control.*, 2017; 75, 1-13.
18. Brockstedt, D.G.; Giedlin, M.A.; Leong, M.L.; Bahjat, K.S.; Gao, Y.; Luckett, W.; et al. *Listeria*-based cancer vaccines that segregate immunogenicity from toxicity. *Proc Natl Acad Sci USA*; 2004; 101: 13832-13837.
19. Brugère-Picoux, J. Ovine listeriosis. *Small Ruminant Res.*, 2008., 76(1-2), 12-20.
20. Bruhn, K.W., Craft, N.; Miller, J.F. *Listeria* as a vaccine vector. *Microbes Infect.*, 2007; 9: 1226–1235.
21. Busch, D. H.; Pamer, E. G. T-lymphocyte dynamics during *Listeria monocytogenes* infection. *Immunol. Lett.*, 1999; 65: 93–98.
22. Calderón-González, R.; Frande-Cabanes, E.; Bronchalo-Vicente, L.; Lecea-Cuello, M.J.; Pareja, E.; Bosch-Martínez, A.; et al. Cellular vaccines in listeriosis: role of the *Listeria* antigen GAPDH. *Front Cell Infect Microbiol.*, 2014; 4,22.
23. Calderón-Gonzalez, R.; Tobes, R.; Pareja, E.; Frande-Cabanes, E.; Alaez-Alvarez, L.; Petrovsky, N.; et al. Identification and characterisation of T-cell epitopes for incorporation into dendritic cell-delivered *Listeria* vaccines. *J Immunol Methods.*, 2015; 9: 111–119.

24. Calderón-Gonzalez, R.; Teran-Navarro, H.; Frande-Cabanes, E.; Ferrandez-Fernandez, E.; Freire, J.; Penades, S.; et al. Pregnancy Vaccination with Gold Glyco-Nanoparticles Carrying *Listeria monocytogenes* Peptides Protects against Listeriosis and Brain and Cutaneous-Associated Morbidities. *Nanomaterials.*, 2016; 6: 151.
25. Calderón-Gonzalez, R.; Frande-Cabanes, E.; Teran-Navarro, H.; et al. GNP-GAPDH₁₋₂₂ nanovaccines prevent neonatal listeriosis by blocking microglial apoptosis and bacterial dissemination. *Oncotarget.*, 2017; 8(33): 53916-53934.
26. Carrero, J.A.; Vivanco-Cid, H.; Unanue, E.R. Listeriolysin o is strongly immunogenic independently of its cytotoxic activity. *PLoS One.*, 2012; 7(3).
27. Cartwright, E.J.; Jackson, K.A.; Johnson, S.D.; Graves LM; Silk, B.J.; Mahon, B.E. Listeriosis Outbreaks and Associated Food Vehicles, United States, 1998–2008. *Emerg Infect Dis.*, 2013;19(1):1-9. doi:10.3201/eid1901.120393.
28. Centers for Disease Control and Prevention - CDC. Disponible in: <https://www.cdc.gov/listeria/index.html>.
29. Center for Food Security e Public Health – CFSPH. Listeriosis., 2019. Disponible in: www.cfsph.iastate.edu/DiseaseInfo/disease.php?name=listeriosis&lang=en.
30. Choi, M.H.; Park, Y.J.; Kim, M.; Seo, Y.H.; Kim, Y.A.; Choi, J.Y.; et al. Increasing Incidence of Listeriosis and Infection-associated Clinical Outcomes. *Ann Lab Med.*, 2018; 38(2): 102–109.
31. Dalrymple, S.A.; Lucian, L.A.; Slattery, R.; McNeil, T.; Aud, D.M.; Fuchino, S.; et al. Interleukin-6-deficient mice are highly susceptible to *Listeria monocytogenes* infection: correlation with inefficient neutrophilia. *Infect Immun.*, 1995; 63: 2262-2268.
32. Darji, A.; Bruder, D.; zur Lage, S.; Gerstel, B.; Chakraborty, T.; Wehland, J.; et al. The role of the bacterial membrane protein ActA in immunity and protection against *Listeria monocytogenes*. *The Journal of Immunology.*, 1998; 161(5): 2414-2420.
33. Datta, S.K.; Okamoto, S.; Hayashi, T.; Shin, S.S.; Mihajlov, I.; Fermin, A.; et al. Vaccination with irradiated *Listeria* induces protective T cell immunity. *Immunity.*, 2006; 25: 143–152.
34. De Sá, F.R.N.; Sztajn bok, J.; De Almeida, J.F.L.; Troster, E.J.; Vaz, F.A.C. *Listeria monocytogenes* pneumonia in a cirrhotic child. *Int J Clin Pract.*, 2004; 58: 536-538.

35. Dhama, K.; Karthik, K.; Tiwari, R.; Shabbir, M.Z.; Barbuddhe, S.; Malik, S.V.S.; et al. Listeriosis in animals, its public health significance (food-borne zoonosis) and advances in diagnosis and control: a comprehensive review. *Veterinary Quarterly.*, 2015; 35(4), 211-235.
36. Dowd, G.C.; Bahey-el-din, M.; Casey, P.G.; Joyce, S.A.; Hill, C.; Gahan, C.G.M. *Listeria monocytogenes* mutants defective in gallbladder replication represent safety-enhanced vaccine delivery platforms. *Hum. Vaccines Immunother.*, 2016; 12: 2059–2063.
37. Drevets, D., A.; Bronze, M.S. *Listeria monocytogenes*: epidemiology, human disease, and mechanisms of brain invasion. *FEMS Immunol Med Microbiol.*, 2008; 53 (20):151–165.
38. Dunn, P.L.; North, R.J. Early gamma interferon production by natural killer cells is important in defense against murine listeriosis. *Infect Immun.*, 1991; 59: 2892-2900.
39. Dussurget, O.; Bierne, H.; Cossart P. The bacterial pathogen *Listeria monocytogenes* and the interferon family: type I, type II and type III interferons. *Front Cell Infect Microbiol.*, 2014; 28:4:50.
40. D’Orazio, S.E.; Troese, M.J.; Starnbach, M.N. Cytosolic localization of *Listeria monocytogenes* triggers an early IFN-gamma response by CD8 T cells that correlates with innate resistance to infection. *J Immunol.*, 2006.; 177: 7146–7154.
41. Edelson, B.T.; Unanue, E.R. MyD88-Dependent but Toll-Like Receptor 2-Independent Innate Immunity to *Listeria*: No Role for Either in Macrophage Listericidal Activity. *J Immunol.*, 2002; 1, 169 (7) 3869-3875. doi: 10.4049/jimmunol.169.7.3869.
42. Esper, M.R.N.R.; Pessoa, G.V.A.; Hofer, E.; Lee, I.M.L.; Melles, C.E.A.; Sakata, E.E.; et al. Meningite por *Listeria monocytogenes* em São Paulo, Brasil. *Rev Inst Adolfo Lutz.*, 1978; 38: 37-41.
43. European Center for Disease Prevention and Control (ECDC). Listeriosis – Annual. Epidemiological Report for 2017. Disponível in: <https://www.ecdc.europa.eu/en/listeriosis>.
44. Fairley, R.A.; Colson, M. Enteric listeriosis in a 10-month-old calf. *N Z Vet J.*, 2013; 61:376–378.
45. Farag, M.D.E-D.H.; Shamsuzzaman, K.; Borsa, J. Radiation sensitivity of *Listeria monocytogenes* in phosphate buffer, Trypticase soy broth, and poultry feed. *J Food Prot.*, 1990; 53:648-651.
46. Farber, J. M.; Peterkin, P. I. *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. *Microbiol Rev.*, 1991; 55: 476–511.

47. Frick O.L.; Teuber, S.S.; Buchanan, B.B.; Morigasaki, S.; Umetsu, D.T. Allergen immunotherapy with heat-killed *Listeria monocytogenes* alleviates peanut and food-induced anaphylaxis in dogs. *Allergy*, 2005; 60: 243–250.
48. Gahan, C.G.; Collins, J. K. Vaccination of mice with attenuated mutants of *Listeria monocytogenes*: requirement for induction of macrophage Ia expression. *Microb Pathog.*, 1995; 18, 417–422.
49. Gaillard, J.L.; Berche, P.; Sansonetti, P. Transposon mutagenesis as a tool to study the role of hemolysin in the virulence of *Listeria monocytogenes*. *Infect Immun.*, 1986; 52 (1): 50-55.
50. Galiza, G.J.N., Silva, M.L.C.R., Dantas, A.F.M., Simões, S.V.D., Riet-Correa, F. Doenças do sistema nervoso de bovinos no semiárido nordestino. *Pesquisa Veterinária Brasileira.*, 2010; 30: 267–276.
51. Garcia-Montero, M.; Rodriguez-Garcia, J.L.; Calvo, P.; González, J.M.; Fernández-Garrido, M.; Loza, E.; et al. Pneumonia caused by *Listeria monocytogenes*. *Respiration.*, 1995; 62(2): 107-109.
52. Gaul, L.K.; Farag, N.H.; Shim, T.; Kingsley, M.A.; Silk, B.J.; Hyytia-Trees, E. Hospital-acquired listeriosis outbreak caused by contaminated diced Celeryd - Texas, 2010. *Clin Infect Diseases.*, 2013; 56(1): 20-26. doi: 10.1093/cid/cis817.
53. Geginat, G.; Lalic, M.; Kretschmar, M.; Goebel, W.; Hof, H.; Palm, D.; et al. Th1 cells specific for a secreted protein of *Listeria monocytogenes* are protective *in vivo*. *J Immunol.*, 1998; 160: 6046-6055.
54. Geginat, G.; Schenk, S.; Skoberne, M.; Goebel, W.; Hof, H. A novel approach of direct *ex vivo* epitope mapping identifies dominant and subdominant CD4 and CD8T cell epitopes from *Listeria monocytogenes*. *J Immunol.*, 2001;166:1877–84.
55. Gentschev, I; Dietrich, G.; Spreng, S.; Kolb-Mäurer, A.; Brinkmann, V.; Grode, L.; et al. Recombinant attenuated bacteria for the delivery of subunit vaccines. *Vaccine.*, 2001;19: 2621–2628.
56. Gessain, G.; Tsai, Y.; Travier, L.; Bonazzi, M.; Grayo, S.; Cossart, P.; et al. PI3-kinase activation is critical for host barrier permissiveness to *Listeria monocytogenes*. *J Exp Med.* 2015; 212: 165-83.
57. Gillespie, I.A.; Mook, P.; Little, C.L.; Grant, K.; Adak, G.K. *Listeria monocytogenes* infection in the Over-60s in England between 2005 and 2008: a retrospective case–control study utilizing market research panel data. *Foodborne Pathog Dis.*, 2010; 7:1373-1379.

58. Goossens, P.L.; Milon, G. Induction of protective CD8⁺ T lymphocytes by an attenuated *Listeria monocytogenes actA* mutant. *Int Immunol.*, 1992; 4: 1413–1418.
59. Gottlieb, S.L.; Newbern, E.C.; Griffin, P.M.; Graves, L.M.; Hoekstra, R.M.; Baker, N.L., et al. Multistate outbreak of listeriosis linked to turkey deli meat and subsequent changes in US regulatory policy. *Clin Infect Dis.*, 2006;42:29–36. doi: 10.1086/498113.
60. Goulet, V.; Hedberg, C.; Le Monnier, A.; de Valk H. Increasing incidence of listeriosis in France and other European countries. *Emerg Infect Dis.*, 2008; 14: 734–740.
61. Goulet, V.; King, L. A.; Vaillant, V.; de Valk, H. What is the incubation period for listeriosis? *BMC Infect Dis.*, 2013., 13(1): 11.
62. Gray, M. L.; Killinger, A. H. *Listeria monocytogenes* and listeric infections. *Bacteriol Rev.*, 1966; 30(2): 309–382.
63. Griffiths, K.L.; Khader, S.A. Novel vaccine approaches for protection against intracellular pathogens. *Curr Opin in Immunol.* 2014; 28: 58–63.
64. Guedes K.M.R., Riet-Correa F., Dantas A.F.M., Simões S.V.D., Neto E.G.M., Nobre V.M.T. & Medeiros R.M.T. 2007. Doenças do sistema nervoso central em caprinos e ovinos no semiárido. *Pesq. Vet. Bras.* 27:29-38.
65. Guleria, I.; Pollard, J.W. Aberrant macrophage and neutrophil population dynamics and impaired Th1 response to *Listeria monocytogenes* in colony-stimulating factor 1-deficient mice. *Infect Immun.*, 2001; 69:1795-1807.
66. Gunn, G.R.; Zubair, A.; Peters, C.; Pan, Z.K.; Wu, T.C.; Paterson, Y. Two *Listeria monocytogenes* vaccine vectors that express different molecular forms of human papilloma virus-16 (HPV-16) E7 induce qualitatively different T cell immunity that correlates with their ability to induce regression of established tumors immortalized by HPV-16. *J Immunol.*, 2001; 167, 6471–6479.
67. Hamon, M.; Bierne, H.; Cossart, P. *Listeria monocytogenes*: a multifaceted model. *Nat Rev Microbiol.*, 2006; 4: 423-434.
68. Harty, J.T.; Bevan, M.J. Specific immunity to *Listeria monocytogenes* in the absence of IFN gamma. *Immunity.*, 1995; 3: 1 09–117.
69. Hansen, G.; Yeung, V.P.; Berry, G.; Umetsu, D.T.; De Kruffyff, R.H. Vaccination with heat-killed *Listeria* as adjuvant reverses established allergen-induced airway hyperreactivity and inflammation: role of CD8⁺ T cells and IL-18. *J Immunol.*, 2000; 164:223–30.

70. Headley, S.A.; Fritzen, J.T.; Queiroz, G.R.; Oliveira, R.A.; Alfieri, A.F.; Di Santis, G.W.; et al. Molecular characterization of encephalitic bovine listeriosis from southern Brazil. *Trop Anim Health Prod.*, 2014; 46: 19-25.
71. Hellström, S.; Kiviniemi, K.; Autio, T.; Korkeala, H. *Listeria monocytogenes* is common in wild birds in Helsinki region and genotypes are frequently similar with those found along the food chain. *J Appl Microbiol.*, 2008; 104: 883–888.
72. Hess, J.; Gentschev, I.; Miko, D.; Welzel, M.; Ladel, C.; Goebel, W.; et al. Superior efficacy of secreted over somatic antigen display in recombinant *Salmonella* vaccine induced protection against listeriosis. *Proc Natl Acad Sci USA.*, 1996; 93(4):1458-1463.
73. Hoelzer, K.; Pouillot, R.; Dennis, S. Animal models of listeriosis: a comparative review of the current state of the art and lessons learned. *Vet Res.*, 2012; 43(1): 18.
74. Hofer, C.B.; Melle, C.E.A.; Hofer, E. *Listeria monocytogenes* in renal transplant recipients. *Rev. Inst. Med. Trop.*, 1999; 41: 375-377.
75. Hofer, E.; Menezes, D.M.F. Isolamento de *Listeria monocytogenes* em secreção vaginal. In: Congresso Brasileiro de Microbiologia, 1., 1969, Rio de Janeiro. Resumos. Rio de Janeiro: SBM., 1969. p.158.
76. Honda-Okubo, Y.; Kolpe, A.; Li, L.; Petrovsky, N. A single immunization with inactiv-ated H1N1 influenza vaccine formulated with delta inulin adjuvant (Advax™) overcomes pregnancy-associated immune suppression and enhances passiveneonatal protection. *Vaccine.*, 2014; 2136:4651–9.
77. Huhtanen, C.N.; Jenkins, R.K.; Thayer, D.W., Gamma radiation sensitivity of *Listeria monocytogenes*. *J. Food Protect.*, 1989; 9: 610–613.
78. Instrução Normativa nº 9, de 8 de abril de 2009. Disponível in: http://www.agricultura.gov.br/assuntos/inspecao/produtos-animal/control-de-patogenos/arquivos-control-de-patogenos/in_09-_de_8_de_abril_de_2009.pdf.
79. Ito, S. I., Ishii, K. J., Shiota, H., Klinman, D. M. CpG oligodeoxynucleotides improve the survival of pregnant and fetal mice following *Listeria monocytogenes* infection. *Infection and immunity.*, 2004; 72(6): 3543-3548.
80. Ikonomidis, G.; Portnoy, D.A.; Gerhard, W.; Paterson, Y. Influenza-specific immunity induced by recombinant *Listeria monocytogenes* vaccines. *Vaccine.*, 1997. 15:433–440.
81. Jackson, T.L.; Eykyn, S.J.; Graham, E.M.; Stanford, M.R. Endogenous bacterial endophthalmitis: a 17-year prospective series and review of 267 reported cases. *Survey of ophthalmology.*, 2003; 48(4): 403-423.

82. Jackson, K.; Gould, L.; Hunter, J.C.; Kucerova, Z.; Jackson, B. Listeriosis Outbreaks Associated with Soft Cheeses, United States, 1998–2014. *Emerg Infect Dis.*, 2018; 24(6), 1116-1118.
83. Jayaraj, K.; Di Bisceglie, A. M.; Gibson, S. Spontaneous bacterial peritonitis caused by infection with *Listeria monocytogenes*: a case report and review of the literature. *The American journal of gastroenterology.*, 1998. 93(9), 1556-1558.
84. Jazani, N.H.; Karimzad, M.; Mazloomi, E.; Sohrabpour, M.; Hassan, Z.M.; Ghasemnejad, H.; et al. Evaluation of the adjuvant activity of naloxone, an opioid receptor antagonist, in combination with heat-killed *Listeria monocytogenes* vaccine. *Microbes Infect.*, 2010; 12(5), 382-388.
85. Jia, Q.; Dillon, B.J.; Maslesa-Galic, S.; Horwitz, M.A. *Listeria*-vectored vaccine expressing the *Mycobacterium tuberculosis* 30 kDa major secretory protein via the constitutively active prfA* regulon boosts BCG efficacy against tuberculosis. *Infect Immun.*, 2017; 85: e00245–00217.
86. Kida, K.; Osada, N.; Isahaya, K.; Mikami, T.; Yoneyama, K.; Kongoji, K.; et al. *Listeria* endocarditis with acute thoracoabdominal aortic dissection. *Internal Med.*, 2007; 46(15): 1209-1212.
87. Koga, T.; Mitsuyama, M.; Handa, T.; Yayama, T.; Muramori, K.; Nomoto, K. Induction by killed *Listeria monocytogenes* of effector T-cells mediating delayed-type hypersensitivity but no protection in mice. *Immunology.*, 1987; 62:241-248.
88. Kolb-Mäurer, A.; Gentschev, I.; Fries, H.W.; Fiedler, F.; Bröcker, E.B.; Kämpgen, E.; et al. *Listeria monocytogenes*-Infected Human Dendritic Cells: Uptake and Host Cell Response. *Infect Immun.*, 2000; 68(6): 3680-3688.
89. Kono, M.; Nakamura, Y.; Suda, T.; Uchijima, M.; Tsujimura, K.; Nagata, T.; et al. Enhancement of protective immunity against intracellular bacteria using type-1 polarized dendritic cell (DC) vaccine. *Vaccine.*, 2012; 30(16): 2633-2639.
90. Lallemand, A.V.; Gaillard, D.A.; Paradis, P. H.; Chippaux, C.G. Fetal listeriosis during the second trimester of gestation. *Pediatric pathology.*, 1992; 12(5): 665-671.
91. Lam, G.Y.; Fattouh, R.; Muise, A.M.; Grinstein, S.; Higgins, D.E.; Brumell, J.H. Listeriolysin O suppresses phospholipase C-mediated activation of the microbicidal NADPH oxidase to promote *Listeria monocytogenes* infection. *Cell Host Microbe.*, 2011; 10: 627–634.
92. Lamont, R.F.; Sobel, J.; Mazaki-Tovi, S.; et al. Listeriosis in human pregnancy: a systematic review. *J Perinat Med.*, 2011; 39: 227–236.

93. Landgraf, I.M.; Kobata, A.M.M.; Jakabi, M.; Kirschbaum, C.R.A.; Marchi, C.R. Surto de meningite neonatal por *Listeria monocytogenes*. *Rev Inst Adolfo Lutz.*, 1999; 58: 63-67.
94. Lauer, P.; Hanson, B.; Lemmens, E.E.; Liu, W.; Luckett, W.S.; Leong, M.L.; et al. Constitutive activation of the PrfA regulon enhances the potency of vaccines based on live-attenuated and killed but metabolically active *Listeria monocytogenes* strains. *Infect Immun.*, 2008; 76:3742–3753.
95. Laureyns, J.; Moyaert, H.; Werbrouck, H.; Catry, B.; de Kruif, A.; Pasmans, F. Pustular dermatitis by *Listeria monocytogenes* after the assisted delivery of a dead calf. *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift.*, 2008; 77: 29-34.
96. Lauvau, G.; Vijn, S.; Kong, P.; Horng, T.; Kerksiek, K.; Serbina, N.; et al. Priming of memory but not effector CD8 T cells by a killed bacterial vaccine. *Science.*, 2001; 294: 1735–1739.
97. Layton, R.C.; Petrovsky, N.; Gigliotti, A.P.; Pollock, Z.; Knight, J.; Donart, N.; et al. Delta inulin polysaccharide adjuvant enhances the ability of split-virion H5N1 vaccine to protect against lethal challenge in ferrets. *Vaccine.*, 2011; 29:6242–6251.
98. Lecuit, M.; Vandormael-Pournin, S.; Lefort, J.; Huerre, M.; Gounon, P.; Dupuy, C.; et al. A transgenic model for listeriosis: role of internalin in crossing the intestinal barrier. *Science.*, 2001; 292:1722-1725.
99. Leimeister-Wäffichter, M.; Haffner, C.; Domann, E.; Goebel, W.; Chakraborty, T. Identification of a gene that positively regulates expression of listeriolysin, the major virulence factor of *Listeria monocytogenes*. *Proc Natl Acad Sci USA*; 1990., 87:8336-8340.
100. Lennon, D.; Lewis, B.; Mantell, C.; Becroft, D.; Dove, B.; Farmer, K.; et al. Epidemic perinatal listeriosis. *Pediatric Infectious Disease.*, 1984; 3:30–34.
101. Li, X.M.; Srivastava, K.; Huleatt, J.W.; Bottomly, K.; Burks, A.W.; Sampson, H. Engineered recombinant peanut protein and heat-killed *Listeria monocytogenes* coadministration protects against peanut-induced anaphylaxis in a murine model. *J Immunol.*, 2003; 170(6): 3289–3295.
102. Low, J.C.; Donachie, W. A Review of *Listeria monocytogenes* and Listeriosis. *Vet J.*, 1997; 153: 9-29.
103. Malik, S.V.; Barbuddhe, S.B.; Chaudhari, S.P. Listeric infections in humans and animals in the Indian subcontinent: a review. *Trop Anim Health Prod.*, 2002; 34:359–381.

104. Marzo, A.L.; Vezys, V.; Klonowski, K.D.; Lee, S.J.; Muralimohan, G.; Moore, M.; et al. Fully functional memory CD8 T cells in the absence of CD4 T cells. *J Immunol.*, 2004; 173:969–975.
105. McCollum, J.T.; Cronquist, A.B.; Silk, B.J.; Jackson, K.A.; O’Connor, K.A.; Cosgrove, S.; et al. Multistate outbreak of listeriosis associated with cantaloupe. *N Engl J Med.*, 2013; 369: 944–953.
106. Mehmood, H.; Marwat, A.D.J.K.; Khan, N.A.J. Invasive *Listeria monocytogenes* gastroenteritis leading to stupor, bacteremia, fever, and diarrhea: a rare life-threatening condition. *J Investig Med High Impact Case Rep.*, 2017; 5(2): 1-3. doi:10.1177/2324709617707978.
107. Mereghetti, L.; van der Mee, N.M.; Laudat, P.; Loulevgue, J.; Jeannou, J.; Audurier, A. *Listeria monocytogenes* septic arthritis in a natural joint: report of a case and review. *Clinical Microbiol Infect.*, 1998; 4(3): 165-168.
108. Ministério da Saúde. Portaria de consolidação nº 4, de 28 de setembro de 2017. Lista Nacional de Notificação Compulsória, 2017. Disponível in: <https://www.saude.gov.br/vigilancia-em-saude/lista-nacional-de-notificacao-compulsoria>.
109. Miller, M.A.; Skeen, M. J.; Ziegler, H.K. Protective immunity to *Listeria monocytogenes* elicited by immunization with heat-killed *Listeria* and IL-12: Potential mechanism of IL-12 adjuvanticity. *Ann NY Acad Sci.*, 1996; 797: 207-227.
110. Mylonakis, E.; Hohmann, E.L.; Calderwood, S.B. Central nervous system infection with *Listeria monocytogenes*. 33 years’ experience at a general hospital and review of 776 episodes from the literature. *Medicine (Baltimore).*, 1998; 77:313–336.
111. National Institute for Communicable Disease/NICD, 2018. Media statement by the Minister of Health Dr Aaron Motsoaledi regarding the update on the Listeriosis outbreak in South Africa. Disponível in: <https://www.nicd.ac.za/source-of-listeria-outbreak-identified/>.
112. Niemann, H.H.; Jäger, V.; Butler, P.J.G.; van den Heuvel, J.; Schmidt, S.; Ferraris, D; et al. Structure of the human receptor tyrosine kinase met in complex with the listeria invasion protein InlB. *Cell.*, 2007; 130(2) : 235–246.
113. Nightingale, K.K.; Schukken, Y.H.; Nightingale, C.R.; Fortes, E.D.; Ho, A.J.; Her, Z.; et al. Ecology and Transmission of *Listeria monocytogenes* Infecting Ruminants and in the Farm Environment. *Appl Environm Microbiol.*, 2004; 70: 4458–4467.

114. Noordhout, C.M; Devleeschauwer, B.; Ângulo, F.J.; Verbeke, G.; Haagsma, J.; Kirk, M.; et al. The global burden of listeriosis: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis.*, 2014; 14:1073–1082.
115. Oevermann, A.; Di Palma, S.; Doherr, M. G.; Abril, C.; Zurbriggen, A.; Vandeveldel, M. Neuropathogenesis of naturally occurring encephalitis caused by *Listeria monocytogenes* in ruminants. *Brain Pathology.*, 2010; 20(2): 378-390.
116. Oevermann, A.; Zurbriggen, A.; Vandeveldel, M. Rhombencephalitis caused by *Listeria monocytogenes* in humans and ruminants: a zoonosis on the rise?. *Interdisciplinary perspectives on infectious diseases.*, 2010; 2010b.
117. Ooi, S.T.; Lorber, B. Gastroenteritis due to *Listeria monocytogenes*. *Clin Infect Dis.*, 2005; 40(9): 1327-1332.
118. Orsi R.H.; den Bakker H.C.; Wiedmann M. *Listeria monocytogenes* lineages: genomics, evolution, ecology, and phenotypic characteristics. *Int J Med Microbiol.*, 2011; 301: 79–96.
119. Orsi, R.H; Wiedmann, M. Characteristics and distribution of *Listeria* spp., including *Listeria* species newly described since 2009. *Appl Microbiol Biotechnol.*, 2016; 100:5273-5287.
120. Ottesen, A.; Ramachandran, P.; Reed, E.; White, J. R.; Hasan, N.; Subramanian, et al. Enrichment dynamics of *Listeria monocytogenes* and the associated microbiome from naturally contaminated ice cream linked to a listeriosis outbreak. *BMC Microbiol.*, 2016; 16(1): 275.
121. Pamer, Eric G. Immune responses to *Listeria monocytogenes*. *Nat Rev Immunol.*, 2004; 4(10): 812-823.
122. Pasquale, A. D.; Preiss, S.; Silva, F. T. D.; Garçon, N. Vaccine adjuvants: from 1920 to 2015 and beyond. *Vaccines*, 2015; 3(2), 320-343.
123. Pilgrim, S.; Kolb-Mäurer, A.; Gentschev, I.; Goebel, W.; Kuhn, M. Deletion of the Gene Encoding p60 in *Listeria monocytogenes* Leads to Abnormal Cell Division and Loss of Actin-Based Motility. *Infect Immun.* 2003;71(6):3473-3484.
124. Pirš, T.; Zdovc, I.; Gombač M.; Švara, T. Juntos, P.; Vengušt M. *Listeria monocytogenes* septicaemia in a foal. *Slov Vet Res.*, 2005; 42: 49-53.
125. Pontello, M.; Guaita, A.; Sala, G.; Cipolla, M.; Gattuso, A.; Sonnessa, M.; et al. *Listeria monocytogenes* serotypes in human infections (Italy, 2000-2010). *Ann Ist Supe. Sanita.*, 2012; 48(2):146-50.

126. Posfay-Barbe, K.M.; Wald, E.R. Listeriosis. *Seminars in fetal e neonatal medicine.*, 2009; 14: 228-233.
127. Poulsen, K.P.; Czuprynski C.J. Pathogenesis of listeriosis during pregnancy. *Anim. Health Res Rev.*, 2013; 14: 30–39.
128. Potel, J. Granulomatosis infantiseptica. *Zentralbl Bakteriolog Orig.*, 1952; 158:329–332.
129. Rachmilewitz, D.; Katakura, K.; Karmeli, F.; Hayashi, T.; Reinus, C.; Rudensky, B.; et al. Toll-like receptor 9 signaling mediates the anti-inflammatory effects of probiotics in murine experimental colitis. *Gastroenterology.*, 2004; 126, 520–528.
130. Rawool, D.B.; Malik, S.V.S.; Shakuntala, I.; Sahare, A.M.; Barbuddhe, S.B. Detection of multiple virulence-associated genes in *Listeria monocytogenes* isolated from bovine mastitis cases. *Int J Food Microbiol.*, 2007; 113:201-207.
131. Resolução/RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001. Disponível in: <https://www.diariodasleis.com.br/busca/exibelink.php?numlink=1-9-34-2001-01-02-12>.
132. Revathi, G.; Suneja, A.; Talwar, V.; Aggarwal, N. Fatal pericarditis due to *Listeria monocytogenes*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.*, 1995; 14(3): 254.
133. Ribeiro L.A.O.; Rodrigues N.C.; Fallavena L.C.B.; Oliveira S.J.; Brito M.A. Listeriose em rebanho de ovinos leiteiros na região serrana do Rio Grande do Sul: relato de caso. *Arq Bras Med Vet Zootec*, 2006; 58: 316-319.
134. Rio, R-D.; E.; Marradi, M.; Calderon-Gonzalez, R.; Frande-Cabanes, E.; Penadés, S.; Petrovsky, N.; et al. A gold glyco-nanoparticle carrying a listeriolysin O peptide and formulated with Advax™ delta inulin adjuvant induces robust T-cell protection against listeria infection. *Vaccine.*, 2015; 33: 1465–1473.
135. Rissi, D.R.; Kommers, G.D.; Marcolongo-Pereira, C.; Schild, A.L.; Barros, C.S.L. Meningoencefalite por *Listeria monocytogenes* em ovinos. *Pesquisa Veterinária Brasileira.*, 2010; 30 (1), 51-56.
136. Rissi, D.R.; Rech, R.R.; Barros, R.R.; Kommers, G.D.; Langohr, I.M.; Pierezan F.; et al. Forma nervosa de listeriose em caprinos. *Pesq Vet Bras.*, 2006; 26(1):14-20.
137. Roberts, A.J.; Wiedmann, M. Pathogen, host and environmental factors contributing to the pathogenesis of listeriosis. *Cell Mol Life Sci.*, 2003; 60(5), 904-918.
138. Rocha, P.R.; Lomonaco, S.; Bottero, M.T.; Dalmaso, A.; Dondo, A.; Grattarola, C.; et al. Ruminant rhombencephalitis-associated *Listeria monocytogenes* strains constitute a genetically homogeneous group related to human outbreak strains. *Appl Environ Microbiol.*, 2013; 79:3059–3066.

139. Romagnoli, P.; Fu, H.; Qiu, Z.; Khairallah, C.; Pham, Q.; Puddington, L.; et al. Differentiation of distinct long-lived memory CD4 T cells in intestinal tissues after oral *Listeria monocytogenes* infection. *Mucosal Immunol.*, 2017; 10 (2); 520–530.
140. Sacco, J.J.; Evans, M.; Harrington, K.J.; Man, S.; Powell, N.; Shaw, R.J. et al. Systemic listeriosis following vaccination with the attenuated *Listeria monocytogenes* therapeutic vaccine, ADXS11-001. *Hum Vaccin Immunother.*, 2016;12:1085–6.
141. Sanches, A.W.; Langohr, I.M.; Stigger, A.L.; Barros, C.S.L. Doenças do sistema nervoso central de bovinos no Sul do Brasil. *Pesqui Vet Bras.*, 2000; 20,1: 113-118.
142. Schlech, W.F.3rd; Lavigne, P.M.; Bortolussi, R.A.; Allen, A.C.; Haldane, E.V.; Wort, A.J.; et al. Epidemic listeriosis—evidence for transmission by food. *N Engl J Med.*, 1983; 308:203–206.
143. Schlech, W.F. Epidemiology and clinical manifestations of *Listeria monocytogenes* infection. *Microbiol Spectr.*, 2019; 793-802.
144. Schoenborn, J.R.; Wilson, C.B. Regulation of interferon- γ during innate and adaptive immune responses. *Adv Immunol.*, 2007; 96: 41–101.
145. Schroeder, H.; van Rensburg, I.B. Generalised *Listeria monocytogenes* infection in a dog. *J S Afr Vet Assoc.*, 1993; 64:133–136.
146. Schwab, J.P.; Edelweiss, M.I.A. Identificação imuno-histoquímica de *Listeria monocytogenes* em placentas fixadas em formol e embebidas em parafina. *Rev. Bras. Ginecol Obstetr.*, 2003; 25: 501-505.
147. Seo, H.S. Application of radiation technology in vaccines development. *Clin Exp Vaccine Res.*, 2015; 4:145-158.
148. Sinha, S.; Kuo, C.Y.; Ho, J.K.; White, P.J.; Jazayeri, J.A.; Pouton, C.W. A suicidal strain of *Listeria monocytogenes* is effective as a DNA vaccine delivery system for oral administration. *Vaccine.*, 2017; 35: 5115–5122.
149. Silva, T.M.A.; Oliveira, R.G.; Mol, J.P.S.; Xavier, M.N.; Paixão, T.A.; Cortez, A.; et al. Etiologic diagnosis of bovine infectious abortion by PCR. *Cienc Rural*, 2009; 39: 2563–2570.
150. Skoberne, M.; Geginat, G. Efficient *in vivo* presentation of *Listeria monocytogenes*-derived CD4 and CD8 T cell epitopes in the absence of IFN- γ . *J Immunol.*, 2002; 168:1854–1860.

151. Starks, H.; Bruhn, K.W.; Shen, H.; Barry, R.A.; Dubensky, T.W.; Brockstedt, D.; et al. *Listeria monocytogenes* as a Vaccine Vector: Virulence Attenuation or Existing Antivector Immunity Does Not Diminish Therapeutic Efficacy. *J Immunol.*, 2004; 1;173(1):420-427.
152. Suassuna, I.; Santos, L.C.; Suassuna, I.R.; Pinheiro, J. Listeriose do sistema nervoso no Estado da Guanabara. In: Congresso Brasileiro de Microbiologia, 1., 1969, Rio de Janeiro. Resumos. Rio de Janeiro: SBM., 1969:161.
153. Swaminathan, B.; Gerner-Smidt, Peter. The epidemiology of human listeriosis. *Microb Infect.*, 2007; 9 (10):1236-43.
154. Teixeira, A.B.; Lana, A.M.A.; Lamounier, J.A.; da Silva, O. P.; Eloi-Santos, S. M. Neonatal listeriosis: the importance of placenta histological examination—a case report. *AJP Rep.*, 2011; 1(01): 003-006.
155. Torres, D.; Barrier, M.; Bihl, F.; Quesniaux, V.J.; Maillet, I.; Akira, S.; et al. Toll-Like Receptor 2 Is Required for Optimal Control of *Listeria monocytogenes* infection. *Infect Immunity.*, 2004; 72(4):2131-2139.
156. Toyoshima, M.T.K.; Apanavicius, A.; Soeiro, A.M.A.; Almeida, G.M.D. de, Arai, M.H. *Listeria monocytogenes* peritonitis in cirrhotic patients: first description in Brazil. *Rev Inst Medic Tropic.*, 2006; 48: 291-293.
157. Travier, L.; Guadagnini, S.; Gouin, E.; Dufour, A.; Chenal-Francisque, V.; Cossart, P.; et al. ActA promotes *Listeria monocytogenes* aggregation, intestinal colonization and carriage. *PLoS Pathog.*, 2013; 9:e1003131.
158. Toyoshima, M.T.K.; Apanavicius, A.; Soeiro, A.M.A.; Almeida, G.M.D. de, Arai, M.H. *Listeria monocytogenes* peritonitis in cirrhotic patients: first description in Brazil. *Rev Inst Medic Tropic.*, 2006; 48: 291-293.
159. Tripp, C.S.; Wolf, S.F.; Unanue, E.R. Interleukin 12 and tumor necrosis factor α are costimulators of interferon γ production by natural killer cells in severe combined immunodeficiency mice with listeriosis, and interleukin 10 is a physiologic antagonist. *Proc Natl Acad Sci USA.*, 1993; 90:3725–29.
160. Tsuji, N.M.; Tsutsui, H.; Seki, E.; Kuida, K.; Okamura, H.; Nakanishi, K.; et al. Roles of caspase-1 in *Listeria* infection in mice. *Int. Immunol.*, 2004; 16: 335–343.
161. Vargas, V.; Alemán, C.; De Torres, I.; Castells, L.; Gavaldá, J.; Margarit, C.; et al. *Listeria monocytogenes*-associated acute hepatitis in a liver transplant recipient. *Liver.*, 1998; 18(3), 213-215.

162. Vázquez-Boland, J.-A.; Kuhn, M.; Berche, P.; Chakraborty, T.; Domínguez-Bernal, G.; Goebel, W.; B.; et al. *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. *Clin Microbiol.*, 2001., 14: 584–640.
163. von Koenig, W.C.H; Finger, H. Failure of killed *Listeria monocytogenes* vaccine to produce protective immunity. *Nature.*, 1982; 297:233-234.
164. Wang, Y.; Lu, L.; Lan, R.; Salazar, J.K.; Liu, J.; Xu, J.; et al. Isolation and characterization of *Listeria* species from rodents in natural environments in China: Isolation and characterization of *Listeria* species. *Emerg Microbes Infect.*, 2017; 6(1), 1-6.
165. Warren, S.E.; Mao, D.P.; Rodriguez, A.E.; Miao, E.A.; Aderem, A. Multiple Nod-like receptors activate caspase 1 during *Listeria monocytogenes* infection. *J Immunol.*, 2008. 180:7558–64.
166. World Health Organization South Africa. Disease outbreak - Listeriosis - South Africa – 28; 2018. Disponible in: <https://www.afro.who.int/search/node?keys=listeria>.
167. Yang, Y.; Hou, J.; Lin, Z.; Zhuo, H.; Chen, D.; Zhang, X.; et al. Attenuated *Listeria monocytogenes* as a cancer vaccine vector for the delivery of CD24, a biomarker for hepatic cancer stem cells. *Cell Mol Immunol.*, 2014; 11:184–196.
168. Yin, Y.; Lian, K.; Zhao, D.; Tao, C.; Chen, X.; Tan, W.; et al. A Promising *Listeria*-Vectored Vaccine Induces Th1-Type Immune Responses and Confers Protection Against Tuberculosis. *Front Cel. Infect Microbiol.*, 2017; 7:407.
169. Zenewicz, L.A.; Shen, H. Innate and adaptive immune responses to *Listeria monocytogenes*: a short overview. *Microbes Infect.*, 2007; 9: 1208-1215.
170. Zhao, X.; Li, Z.; Gu, B.; Frankel, F.R. Pathogenicity and immunogenicity of a vaccine strain of *Listeria monocytogenes* that relies on a suicide plasmid to supply an essential gene product. *Infect Immun.*, 2005; 73: 5789-5798.

CAPÍTULO II

Eficácia vacinal de *Listeria monocytogenes* Gamma irradiada microencapsulada em alginato e quitosana contra listeriose em modelo murino

RESUMO

Listeria monocytogenes é responsável por causar uma doença infecciosa transmitida por alimentos em humanos, caracterizada por manifestações neurológicas, aborto e septicemia principalmente em neonatos. Indivíduos imunossuprimidos, gestantes, idosos e crianças são grupos de risco de maior susceptibilidade à doença. A listeriose é considerada zoonótica, sendo responsável por causar altas taxas de mortalidade humana e também animal (pequenos e grandes ruminantes). A bactéria possui ciclo de vida intracelular que dificulta a construção de vacinas inativadas capazes de induzir resposta imune de células efetoras. Adjuvantes capazes de estimular a resposta imune celular são ferramentas importantes na construção de vacinas contra bactérias intracelulares. Não existem vacinas comerciais disponíveis para o combate a listeriose. O objetivo desse estudo foi avaliar o potencial vacinal da bactéria *L. monocytogenes* inativada por irradiação Gamma (KLM- γ) encapsulada em microcapsulas de alginato associada ou não ao quitosana, contra listeriose em modelo murino. Neste estudo, foi possível observar no quarto dia após desafio a redução na recuperação bacteriana em camundongos vacinados com KLM- γ associado ao alginato ou alginato-quitosana, com menores cargas bacterianas no baço e fígado quando comparados aos grupos não vacinados ou vacinados KLM- γ associado ao hidróxido de alumínio, mas semelhante ao grupo vacinado com KLM- γ associado adjuvante Freund's. Além disso, o estímulo *in vitro* de esplenócitos de camundongos vacinados com KLM- γ associado ao alginato ou alginato-quitosana favoreceu proliferação celular de linfócitos e a produção de IL-10 e IFN- γ . Curiosamente, o grupo vacinado com KLM- γ -alginato-quitosana apresentou lesões hepáticas de menor intensidade com redução de inflamação e necrose associadas à infecção por *L. monocytogenes*. Dessa forma, o encapsulamento de KLM- γ com alginato-quitosana, provou ser uma ferramenta interessante na construção de vacinas inativadas seguras contra listeriose.

Palavras-chaves: vacina; listeriose; encapsulamento, bipolímero

ABSTRACT

Listeria monocytogenes is responsible for causing an infectious foodborne disease in humans, characterized by neurological manifestations, abortion and septicemia mainly in neonates. Immunosuppressed individuals, pregnant women, the elderly and children are risk groups with higher susceptibility to the disease. Listeriosis is considered zoonotic disease, being responsible for causing high rates of human and also animal mortality (small and large ruminants). The bacterium has an intracellular life cycle which makes it difficult to concept inactivated vaccines capable of inducing an effector cell immune response. Adjuvants capable of stimulating cellular immune response are important tools in the construction of vaccines against intracellular bacteria. The aim of this study was to evaluate the vaccine potential of *L. monocytogenes* inactivated by Gamma irradiation (KLM- γ) encapsulated in alginate microcapsules associated or not with chitosan against listeriosis in murine model. It was observed on the fourth day after challenge the reduction in bacterial recovery in mice vaccinated with KLM- γ encapsulated with alginate or alginate-chitosan, with lower bacterial loads in the spleen and liver when compared to non-group vaccinated, vaccinated KLM- γ or KLM- γ associated with aluminum hydroxide, but similar bacterial colonization to the group vaccinated with KLM- γ associated with Freund's adjuvant. The *in vitro* stimulation of splenocytes of mice vaccinated with KLM- γ associated with alginate or alginate-chitosan favored lymphocyte proliferation and production of IL-10 and IFN- γ . Interestingly, the group vaccinated with KLM- γ -alginate-chitosan had lower intensity liver lesions with reduced inflammation and necrosis associated to *L. monocytogenes* infection. Thus, KLM- γ encapsulation with alginato-chitosan proved to be an interesting tool in the construction of inactivated vaccines safe against listeriosis.

Keywords: vaccine; listeriosis; encapsulation, biopolymer

INTRODUÇÃO

Listeriose é uma doença de origem alimentar causada pela bactéria *Listeria monocytogenes* (Vázquez-Boland et al., 2001) normalmente encontrada no meio ambiente. Os produtos alimentícios mais comumente contaminados pela bactéria são: leite, queijos, saladas, carnes e produtos mecanicamente processados como patês e salsichas (Vázquez-Boland et al., 2001; Posfay-Barbe e Wald, 2009; Hernandez-Milian and Payeras-Cifre, 2014). Listeriose humana é uma doença grave capaz de causar danos irreversíveis ou até mesmo a morte. Dependendo do *status* imunológico do indivíduo, as manifestações da listeriose podem ser bem distintas, apresentando-se como uma gastroenterite autolimitante em indivíduos imunocompetentes; provocar sinais neurológicos severos em idosos e imunossuprimidos principalmente; ser septicêmica em neonatos; ou causar perda fetal em gestantes (Hernandez-Milian and Payeras-Cifre, 2014; (Todd and Notermans, 2011). A listeriose neurológica e materno-fetal, consideradas manifestações mais graves da doença em humanos, também são descritas em ruminantes domésticos (Oevermann et al., 2010; Brugère-Picoux, 2008). A silagem contaminada é a principal fonte de infecção do rebanho (Borucki et al., 2005) e a doença pode causar perdas econômicas por redução da produtividade do rebanho.

Atualmente, listeriose é considerada a terceira enfermidade, entre as doenças de origem alimentar, responsável por causar alta letalidade (20%) (Swaminathan e Gerner-Smidt, 2007). Na última década, são os vários relatos de surtos com morte em diferentes países (Noordhout et al. 2014; National Institute for Communicable Disease, NICD 2018, World Health Organization, WHO 2019). A listeriose em países que já sofreram grandes surtos é considerada notificação obrigatória, mas as medidas de prevenção de doenças são escassas, sem vacinas disponíveis no combate à listeriose humana ou animal.

O desenvolvimento de vacinas contra bactérias intracelulares, como *L. monocytogenes*, é desafiador devido ao ciclo intracelular do patógeno e à imunidade protetora do hospedeiro ser dependente de linfócitos T (Griffiths e Khader, 2014). Geralmente vacinas atenuadas são consideradas mais eficazes contra bactérias intracelulares, a exemplo das vacinas comerciais utilizadas no combate a infecção por *Mycobacterium tuberculosis* em humanos (Sable et al., 2019) e contra a infecção por *Brucella* spp em ruminantes (Carvalho et al., 2016). Cepas atenuadas de *Listeria* sp. têm sido amplamente pesquisadas como vacinas vetoriais, devido sua característica imunogênica com forte indução de resposta celular (Bruhn et al., 2007). No entanto, vacinas atenuadas não são consideradas seguras principalmente para indivíduos imunocomprometidos. Vacinas inativadas, como *L. monocytogenes* mortas pelo

calor (HKLM), são incapazes de estimular eficientemente a resposta imune celular efetiva do hospedeiro, não garantindo proteção contra a listeriose em camundongos desafiados com *L. monocytogenes* (Von Koenig et al., 1982; Lauvau et al., 2001).

Considerando o uso de adjuvantes para melhorar a resposta vacinal contra bactérias intracelulares, as microcápsulas constituídas por biopolímeros podem ser consideradas uma ótima opção, pois aumentam a imunogenicidade da vacina devido à liberação lenta do antígeno. Microcápsulas de alginato são polímeros biodegradáveis e biocompatíveis amplamente utilizados como veículo de substâncias principalmente medicamentosas (Severino et al., 2019). Estudos tem associado o uso das microcápsulas de alginato como vacina viva atenuada de *Brucella* spp. em camundongos (Arenas-Gamboa et al., 2008; Silva et al., 2015a), veados (Arenas-Gamboa et al., 2009) e pequenos ruminantes (Silva et al., 2015b). Utilizado também como vacinas portadoras de toxina diférica (Sarei et al., 2013) e de antígeno do vírus da hepatite B (Borges et al., 2008) em camundongos.

A quitosana é um polissacarídeo natural encontrado na parede celular de fungos e exoesqueleto de artrópodes. Devido à sua característica imunogênica e de ser inócuo, tem sido utilizado como veículo para administração de medicamentos (Li et al., 2018), de antígenos vacinais contra *Helicobacter pylori* (Gong et al., 2015) e *Neisseria meningitidis* (Baudner et al., 2004). A quitosana tem a capacidade de estimular a resposta imune celular Th1, ativar a via do inflamassoma com indução de IL-18 e IL-1 e estimular a maturação das células dendríticas em camundongos (Bueter et al., 2014; Carroll et al. 2016). Interessantemente, estudos mostram a interação química entre a quitosana ao alginato permite a formação de um complexo polieletrólítico (George e Abraham, 2006; Li et al., 2018) que resulta na redução dos poros das microcápsulas e diminuição da perda de antígeno encapsulado (Yu et al., 2009). Melhorando a eficiência do encapsulamento e a liberação da substância encapsulada (George e Abraham, 2006; Rahaiee et al., 2015).

Este trabalho teve o objetivo de avaliar o potencial vacinal de candidatas a vacinas constituídas de *L. monocytogenes* gamma irradiada (KLM- γ) encapsuladas com alginato e encapsuladas com alginato e quitosana, na proteção contra infecção por *L. monocytogenes* em camundongos.

MATERIAL E MÉTODOS

Cepa bacteriana e condições de cultivo

O cultivo e manipulação bacteriana foram realizados no Laboratório de Patologia Molecular de biossegurança nível 2 da Escola de Veterinária da UFMG. Amostras de *L. monocytogenes* sorotipo 4b (ATTC 19115) foram cultivadas em 10 mL de caldo BHI (*Brain Heart Infusion*, Kasvi, EUA) a temperatura de 37°C por 15 horas sob agitação a 200 rpm. O pré-inóculo bacteriano foi ajustado para uma concentração de 1×10^8 unidades formadoras de colônia (UFC)/mL, determinada por espectrofotometria (SmartSpec Plus, Bio-Rad, EUA) em uma densidade óptica de 600 nm, e 50 µL adicionados em um novo meio de cultivo BHI de 10 mL a temperatura de 37°C, por aproximadamente 3 horas, sob agitação a 200 rpm até atingir uma concentração de 1×10^9 UFC/mL. Em seguida, o inóculo foi ressuscitado em tampão fosfato salino estéril (PBS) para diluição seriada e confirmação do inóculo em placas contendo BHI ágar (Kasvi).

Preparação de *Listeria monocytogenes* gamma irradiada

Uma suspensão bacteriana na concentração de 1×10^9 UFC/mL foi irradiada com 5 kilograys (kGy) e condicionadas a temperatura de 4°C até o momento de utilização. A irradiação foi realizada no Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear (CDTN) da UFMG. A suspensão de bactérias irradiadas foram plaqueadas em placas BHI ágar (Kasvi) a 37°C por 48 horas para confirmação da inativação, onde não foi observado crescimento de colônias.

Encapsulamento de *Listeria monocytogenes* gamma irradiada

Para o encapsulamento de KLM- γ , uma suspensão contendo 10^9 UFC/mL de KLM- γ em alginato de sódio a 1% (Sigma-Aldrich, EUA) foi adicionada por gotejamento lento a 10 mL de uma solução de cloreto de cálcio (CaCl_2) a 0,5%. Após gotejamento, as microcápsulas formadas foram homogeneizadas por 15 minutos e lavadas duas vezes em solução tampão MOPS (ácido 3- [N-morfolino] propanossulfônico), respectivamente. O procedimento para encapsular KLM- γ em alginato com quitosana (Sigma-Aldrich) seguiu o mesmo protocolo descrito acima com algumas alterações. Após a formação de microcápsulas por gotejamento em CaCl_2 , as microcápsulas contendo 1×10^8 KLM- γ foram homogeneizadas por 1 hora em solução de quitosana a 1% (pH de 4,5 - 5, dissolvido em ácido acético a 1%) e lavadas uma

vez em solução tampão MOPS por 5 minutos. A aparência das microcápsulas produzidas é mostrada na Figura 1A e B.

Avaliação de liberação bacteriana encapsulada

Utilizamos uma suspensão contendo 10^9 UFC/mL de *L. monocytogenes* viáveis e realizamos o procedimento encapsulamento, conforme descrito anteriormente. Após a formação das cápsulas, alíquotas das soluções de lavagem em MOPS foram plaqueadas em BHI ágar para contagem de UFC. Cápsulas contendo as bactérias foram colocadas em solução despolimerizadora (solução contendo citrato de sódio, cloreto de sódio e MOPS), por 10 minutos sob agitação, em seguida diluídas em PBS e plaqueadas em BHI.

Animais utilizados no experimento

Camundongos Balb/c fêmeas de sete semanas de idade, obtidos no Biotério Central da Universidade Federal de Minas Gerais, Brasil, foram utilizados neste estudo. Os camundongos foram mantidos em uma sala a 22°C, 12 horas de luz/12 horas de ciclo escuro, com acesso livre a comida e água. Os experimentos com animais foram aprovados pelo Comitê de Ética Institucional em Experimentação Animal da Universidade Federal de Minas Gerais (protocolo CEUA 144/2017). O designer experimental com vacina KLM- γ encapsulada foi resumido na Figura 1 C.

Escolha da dose infectante de *L. monocytogenes* 4b em camundongo Balb/c

Para definirmos a dose e fase de infecção utilizada nos experimentos, doze animais foram desafiados intraperitonealmente (i.p.) com *L. monocytogenes* 4b utilizando duas doses distintas nas diferentes fases de crescimento bacteriano, sendo: 1×10^4 /animal (n=3) e 10^5 UFC/animal (n=3) nas fases logarítmica (n=3) e estacionária (n=3), observados por até sete dias. A contagem bacteriana recuperada no fígado foi utilizada como critério de seleção para definição da dose e fase de infecção utilizada nos experimentos seguintes. Justamente, por ser considerado órgão de predileção para multiplicação de *L. monocytogenes*.

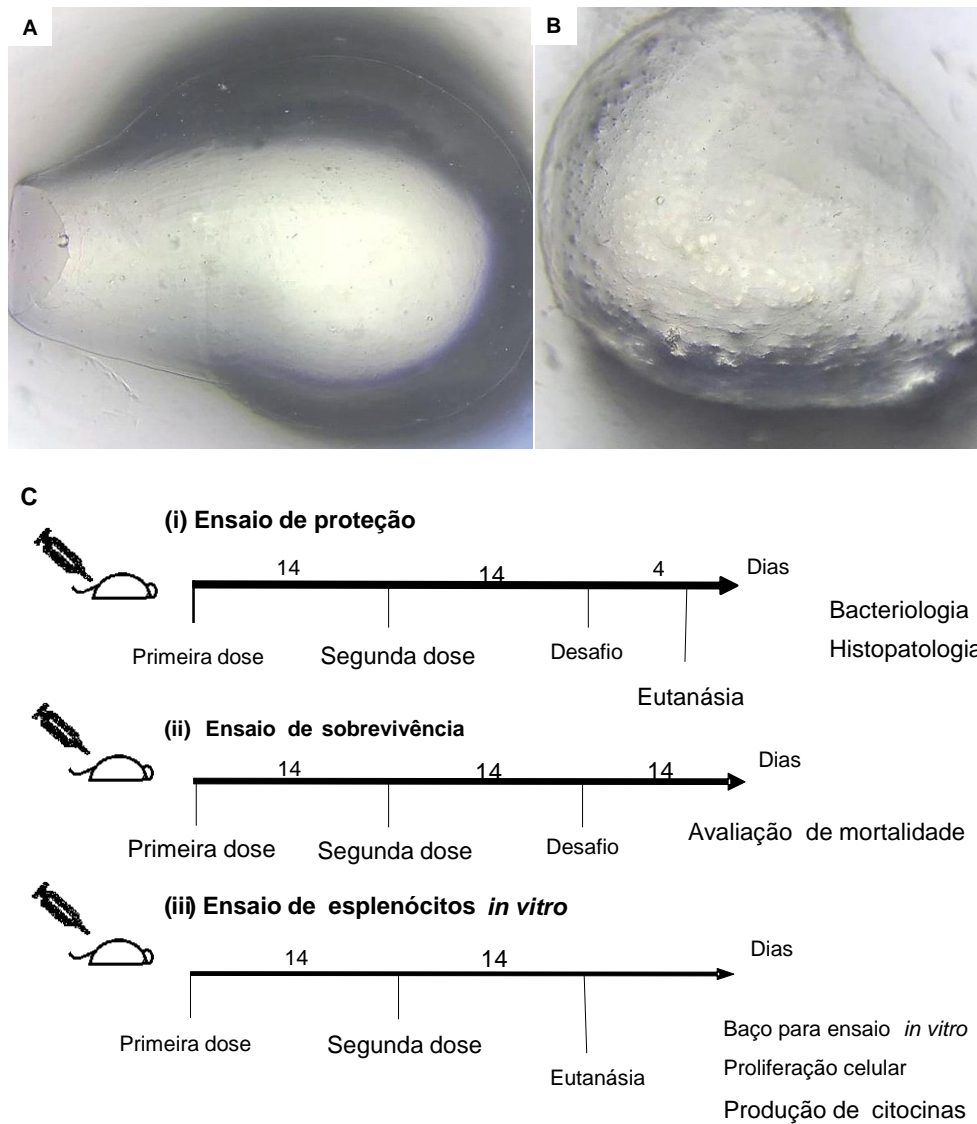


Figura 1 – Imagem por microscopia óptica de microcápsulas KLM- γ -alginato com ou sem quitosana (400x). (A) alginato de KLM- γ medindo 500 - 550 μm (B) KLM- γ -alginato-quitosana medindo 500 - 615 μm . As microcápsulas contidas 1×10^8 KLM- γ foram inoculadas por via subcutânea em camundongos. (C) Desenho experimental da vacinação com microcápsulas de KLM- γ -alginato. (i) Ensaio de proteção vacinal em camundongos vacinados com duas doses, intercaladas entre duas semanas, e desafiados com 1×10^5 UFC *L. monocytogenes*. Material para bacteriologia e histopatologia foram realizadas após 4 dias de infecção; (ii) Ensaio de sobrevivência de camundongos vacinados com duas doses intercaladas entre duas semanas e desafiados com 4×10^6 UFC de *L. monocytogenes*. Mortalidade foi avaliada diariamente por duas semanas; (iii) Ensaio de esplenócitos *in vitro*, os camundongos foram vacinados com duas doses intercaladas entre duas semanas e desafiados com 1×10^5 UFC de *L. monocytogenes*. Quatorze dias após segunda dose, os esplenócitos dos camundongos vacinados foram removidos para estímulo *in vitro*.

Imunização de camundongos e avaliação do índice de proteção contra listeriose

Quarenta camundongos, fêmeas Balb/c, com sete semanas de idade foram distribuídas em sete grupos experimentais de acordo com o tipo de vacina utilizada, sendo: Controle não vacinado (PBS) (n=6); KLM- γ -Adjuvante de Freund's (n=5); KLM- γ -hidróxido de alumínio (n=5); KLM- γ (n=6); Alginato-quitosana vazias (n=6); KLM- γ -alginato (n=6); KLM- γ -alginato-quitosana (n=6). Os camundongos receberam duas doses vacinais, no intervalo de duas semanas por via subcutânea (s.c.), próximo à base da cauda. Cada dose vacinal continha 1×10^7 UFC KLM- γ /camundongo. As microcápsulas de alginato e alginato-quitosana foram aplicadas em dois locais diferentes e com um volume final de 150 μ L. As vacinas contendo adjuvante de Freund's (FA) (Sigma-Aldrich) foram preparadas nas proporções de 1:1 associada à KLM- γ como indicado pela empresa e as vacinas de hidróxido de alumínio (Sigma-Aldrich) preparadas na concentração de 0,5%. Quatorze dias após a última dose vacinal, os animais foram desafiados por via intraperitoneal com 1×10^5 UFC/animal de *L. monocytogenes* e sofreram eutanásia com sobredose de cloridrato de cetamina 10% (300 mg/kg) e cloridrato de xilazina 2% (30 mg/kg), por via intraperitoneal (i.p.), quatro dias após o desafio. Baço e fígado foram pesados e fragmentos de baço e fígado foram coletados para contagem de UFC e histopatologia.

Estimulação *in vitro* de esplenócito murino

Vinte e cinco camundongos Balb/c fêmeas de sete semanas de idade foram distribuídas em quatro grupos experimentais: alginato (n=6); alginato-KLM- γ ; KLM- γ -alginato-quitosana (n=6) e o grupo controle não vacinado (n=7). Foram realizadas duas doses de vacinação via s.c. com intervalo de quatorze dias, conforme descrito anteriormente. Duas semanas após a última dose vacinal os animais foram eutanasiados para a retirada asséptica do baço e isolamento de esplenócitos. O baço foi macerado em placa petri estéril contendo 1 mL de meio de cultivo RPMI 1640 (Sigma-Aldrich) enriquecido com soro fetal bovino (SFB, Sigma-Aldrich) a 10% e condicionado a 4°C. A suspensão celular foi centrifugada a 112 g, por 10 minutos a 4°C, o sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspensionado em 5 mL de tampão de lise de hemácias (*Ammonium Tris-Chloride*, Sigma-Aldrich) por 5 minutos. A suspensão celular foi centrifugada novamente a 112 g, por 10 minutos a 4°C, e após descarte do sobrenadante, o sedimento foi lavado 4 vezes com 10 mL de PBS a 4°C. O sedimento celular então foi ressuspensionado em 1 mL de meio de cultura RPMI 1640 contendo SFB 10% (Sigma-Aldrich) para contagem e avaliação de viabilidade dos esplenócitos. Foram

adicionados 10 μL da suspensão celular a 90 μL de azul de Tripán a 0,3% para realizar a contagem de células em câmara de Neubauer e 5×10^6 células/poço foram distribuídas em uma placa de 96 poços (Corning, EUA) para realização dos tratamentos em duplicata. Foram acrescentados 100 μL de volume de cada tratamento (RPMI ou suspensão de 1×10^9 de KLM- γ) e as placas são mantidas em estufa a 5% de CO_2 a 37°C por 72 horas. Em seguida, as placas foram centrifugadas a 400 g por 10 minutos a temperatura ambiente e o sobrenadante retirado e armazenado a -20°C para dosagem de citocinas por ELISA (ensaio de imunoabsorção enzimática).

Ensaio de proliferação celular

Após a retirada do sobrenadante, foram acrescentados aos poços contendo os esplenócitos 20 μL de MTT (3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide) reagente (Invitrogen, EUA) a 5 mg/mL por poço e as placas novamente incubadas por 2 horas, a 5% de CO_2 a 37°C , protegidas da luz e com umidade de 95%. Adicionamos na placa de 96 poços 30 μL de SDS por poço e novamente as placas mantidas a 5% de CO_2 a 37°C , overnight. Após esse período, as placas foram lidas a um comprimento de onda 595 nm no aparelho de ELISA (Thermo Fisher Scientific, EUA).

Ensaio de citocinas

Níveis de interferon gama (IFN- γ) e interleucina 10 (IL-10) foram mensurados nos sobrenadantes dessas culturas por Kits de ELISA de acordo com o fabricante (R&D systems, EUA) utilizando placas de 96 poços. As citocinas foram quantificadas por ensaio imunoenzimático no aparelho de ELISA (Thermo Fisher Scientific) no comprimento de onda de 490 nm. As concentrações de citocinas (pg/mL) foram determinadas colorimetricamente por comparação com a curva padrão.

Ensaio de sobrevivência ao desafio por *L. monocytogenes*

Cinquenta camundongos Balb/c fêmeas de sete semanas de idade foram distribuídas em cinco grupos experimentais, sendo: KLM- γ -alginato (n=10); KLM- γ -alginato-quitosana (n=10); KLM- γ -adjuvante de Freund's (n=10); Adjuvante de Freund's (n=10) e o grupo controle não vacinado (n=10). Foram realizadas duas doses vacinais via s.c. com intervalo de quatorze dias conforme descrito acima e duas semanas após a última dose vacinal

camundongos foram desafiados i.p. com dose letal contendo 4×10^6 UFC/camundongo de *L. monocytogenes*. Os camundongos foram observados durante quatorze dias.

Histopatologia e imuno-histoquímica

Os fragmentos de fígado foram fixados por imersão em formaldeído tamponado a 10% por 24 horas, seguido de aumento da desidratação em álcool, diafinização em xilol e incorporação de parafina. Os fragmentos foram seccionados a 5 μm e corados por hematoxilina e eosina (HE). Foi atribuído um escore para lesões inflamatórias no fígado de camundongos, atribuindo valores de acordo com a intensidade das lesões: 0 para ausência de lesões, 1 para discreto, 2 para moderado e 3 para intenso. As áreas de necrose receberam escore 0 para ausência e 1 na presença dessa lesão. Para verificar a localização intralesional de *L. monocytogenes*, imuno-histoquímica foi realizada conforme descrito por Rocha et al. (2017) e colaboradores. Resumidamente, as seções foram desparafinizadas, hidratadas e incubadas duas vezes com peróxido de hidrogênio a 10% em PBS por 45 min, seguidas de incubação com leite desnatado (diluição 1:10) como uma solução bloqueadora por 60 min e depois incubadas com anticorpo primário policlonal anti-*L. monocytogenes* (*Listeria O Poly Antiserum sorotypes 1,4*, Difco, USA) na diluição 1: 500 em albumina sérica bovina a 1% por 45 min, em câmara umidificada à temperatura ambiente. As lâminas foram lavadas em PBS e incubadas com anticorpo secundário biotilado por 30 minutos à temperatura ambiente, lavadas novamente em PBS e, depois, incubadas com complexo estreptavidina-peroxidase (kit LSAB; Dako Corporation, EUA) por 30 minutos à temperatura ambiente. A reação foi revelada com solução de AEC (Dako) por 10 minutos e as seções foram contrastadas com a hematoxilina de Mayer.

Análise Estatística

Os dados de análise de proliferação celular e dosagem de citocinas foram submetidos ao teste ANOVA e comparados por teste de Tukey. Para a análise da contagem de UFC foi realizada transformação logarítmica e submetidas ao teste ANOVA e comparados por teste de Tukey. Para índice vacinal a média do grupo controle foram comparados aos diferentes grupos por teste T student. Os dados de sobrevivência foram analisados pelo teste Log-Rank. Os dados foram comparados usando o software GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Prisma software, Inc 5.0, EUA).

RESULTADOS

A colonização bacteriana no fígado de camundongos não difere entre as diferentes fases de crescimento utilizando a mesma dose de infecção

Ao avaliarmos os camundongos desafiados com *L. monocytogenes* 1×10^4 UFC/animal, os animais foram capazes de recuperar da infecção por um período de sete dias, sem haver diferença da carga bacteriana encontrada no fígado dos camundongos, independentemente da fase de crescimento de *Listeria* (logarítmica e estacionária). Entretanto, os grupos de camundongos desafiados com a dose de 1×10^5 UFC/animal covaleceram da doença, com morte acontecendo ao quinto dia de infecção. Utilizando a dose de 1×10^5 UFC/animal observamos que a recuperação bacteriana no fígado tinha sido semelhante em ambas às fases de crescimento bacteriano. Dessa forma, a dose selecionada para os experimentos posteriores foi de 1×10^5 UFC/animal de *L. monocytogenes* em fase logarítmica durante cinco dias de infecção (Figura 2).

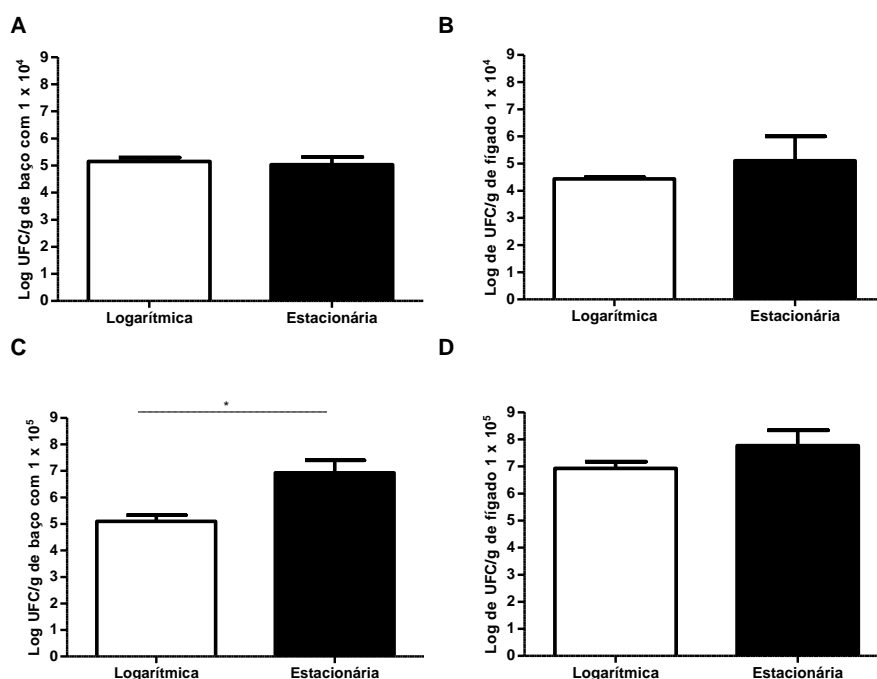


Figura 2 - Escolha da dose infectante de *L. monocytogenes* 4b em camundongo Balb/c. Camundongos foram desafiados via i.p. utilizando 1×10^4 /animal e 1×10^5 UFC/animal nas fases logarítmica e estacionária observados por até sete dias. A seleção da dose e fase de crescimento bacteriano dos experimentos seguintes foi determinada de acordo com a contagem bacteriana encontrada no fígado. (A) Carga bacteriana encontrada no baço e (B) fígado de camundongos desafiados com 1×10^4 UFC/animal; (C) Carga bacteriana encontrada no baço e (D) fígado de

camundongos desafiados com 1×10^5 UFC/animal; Os dados foram transformados em dados logarítmicos e submetidos a one-way ANOVA e as médias comparadas pelo teste de Tukey (* $p < 0,05$).

A vacina KLM- γ sem adjuvante não induz proteção em camundongos Balb/c desafiados com *L. monocytogenes*

A fim de testarmos se a inativação de *L. monocytogenes* através da irradiação gamma seria capaz de proteger camundongos mais sensíveis à infecção por listeriose. Diferentes grupos de camundongos Balb/c foram vacinados utilizando KLM- γ associado ou não a adjuvantes normalmente utilizados em pesquisa vacinal laboratorial, como adjuvante de Freund's (FA) (indutor de resposta Th1, importante contra patógenos intracelulares) e hidróxido de alumínio (Alum) (indutor de resposta Th2 e produção de anticorpos). A carga bacteriana encontrada no baço e fígado de camundongos vacinados apenas com KLM- γ foi semelhante aos grupos não vacinado e vacinado com KLM- γ -Alum (Figura 3A and B). A redução da colonização bacteriana em camundongos Balb/c foi observada apenas no grupo vacinado com KLM- γ -FA, demonstrando que a vacina inativada constituída por KLM- γ era eficaz só quando associada ao indutor adjuvante da resposta Th1.

Vacinas de microcápsulas de alginato associado à KLM- γ são capazes de proteger contra a infecção por *L. monocytogenes*

Microcápsulas de alginato são consideradas seguras e imunogênicas, utilizadas como adjuvante em estudos experimentais (Severino et al., 2019) e a combinação com quitosana melhora pode melhorar a resposta vacinal (George and Abraham, 2006). Assim avaliamos se vacina de KLM- γ encapsulada com alginato no modelo murino. Camundongos vacinados com KLM- γ associada ao alginato tiveram menor recuperação bacteriana no baço e fígado, semelhante ao que foi observado quando KLM- γ associada ao adjuvante de Freund's (Figura 3C e D). Interessantemente, camundongos vacinados com KLM- γ encapsulado com alginato-quitosana também tiveram menor colonização de *L. monocytogenes* no baço e fígado dos animais comparado ao grupo não vacinado, mas tiveram recuperação bacteriana semelhante ao que foi observado nos animais vacinados com KLM- γ -alginato e KLM- γ -adjuvante de Freund's (Figura 3C e D). O índice de proteção vacinal dos grupos vacinados com KLM- γ -adjuvante de Freund's, KLM- γ -alginato e KLM- γ -alginato-quitosana também foram semelhantes (Tabela 2).

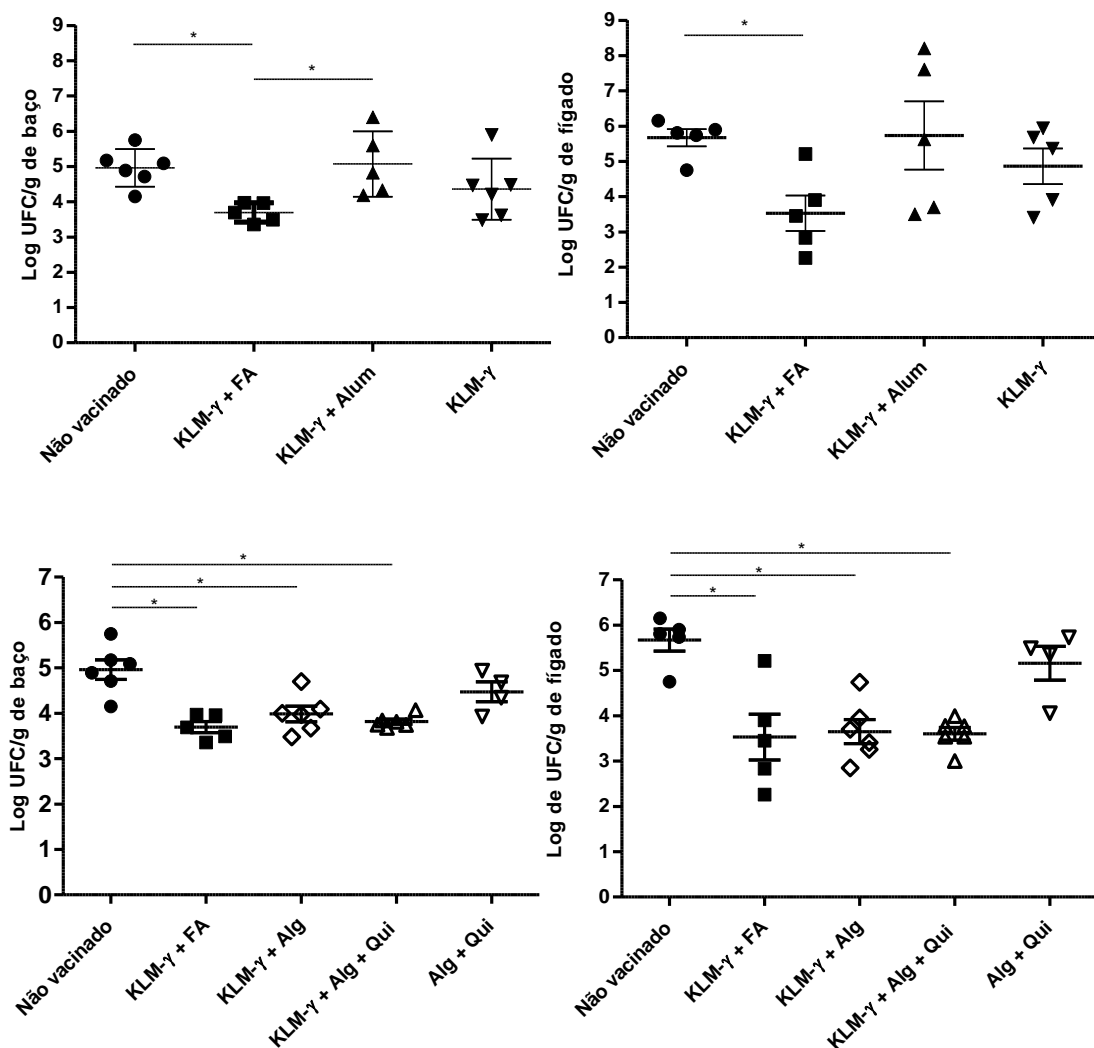


Figura 3 – Recuperação bacteriana no baço e fígado de camundongos vacinados e desafiados com dose subletal de *L. monocytogenes*. Camundongos vacinados com *L. monocytogenes* gama irradiada (KLM- γ); KLM- γ + hidróxido de alumínio (KLM- γ + Alum), KLM- γ + adjuvante de Freund (KLM- γ + FA), PBS (não vacinados), KLM- γ -alginato (KLM- γ + Alg), KLM- γ -alginato-quitosana (KLM- γ - + Alg + Qui) ou cápsulas vazias de alginato + quitosana (Alg + Qui). O baço e o fígado foram coletados no quarto dia após o desafio com 1×10^5 UFC *L.monocytogenes*/camundongo via i.p. Cada ponto representa um camundongo e as barras indicam desvio padrão. Os dados foram transformados em dados logarítmicos e submetidos a one-way ANOVA e as médias comparadas pelo teste de Tukey (* p <0,05).

Tabela 2 – Índice de proteção vacinal dos diferentes grupos vacinados.

KLM- γ + Adjuvante Freund's	* 1,27
KLM- γ + Hidróxido Alumínio	0,01
KLM- γ	0,60
KLM- γ + Alginato	* 0,98
KLM- γ + Alginato + Quitosana	* 1,14
Alginato + Quitosana	0,49

(*) Diferença estatística comparada ao grupo controle ($p < 0,05$).

A vacina KLM- γ associada ao alginato-quitosana protege camundongos Balb/c contra listeriose com redução do insulto hepático

Surpreendentemente, embora a vacina que consiste em KLM- γ associada ao alginato-quitosana tenha apresentado taxas de proteção semelhantes às do KLM- γ - alginato (Figura 3 C e D), o grupo de camundongos vacinados com KLM- γ encapsulado com alginato-quitosana foi o único grupo a apresentar menor intensidade de alterações histopatológicas no fígado após desafio com *L. monocytogenes* quando comparado ao grupo controle (Figura 4 E). O fígado do grupo não vacinado apresentou áreas de necrose multifocal associada a intenso infiltrado neutrofílico (Figura 4A) com bactérias intralesionais (Figura 4C). Enquanto fígado de camundongos vacinados com KLM- γ - alginato-quitosana foi observado infiltrado inflamatório histiocítico multifocal discreto com raras áreas de necrose e ausência de infiltrado neutrofílico (Figura 4B) e bactérias intralesionais raras (Figura 4D).

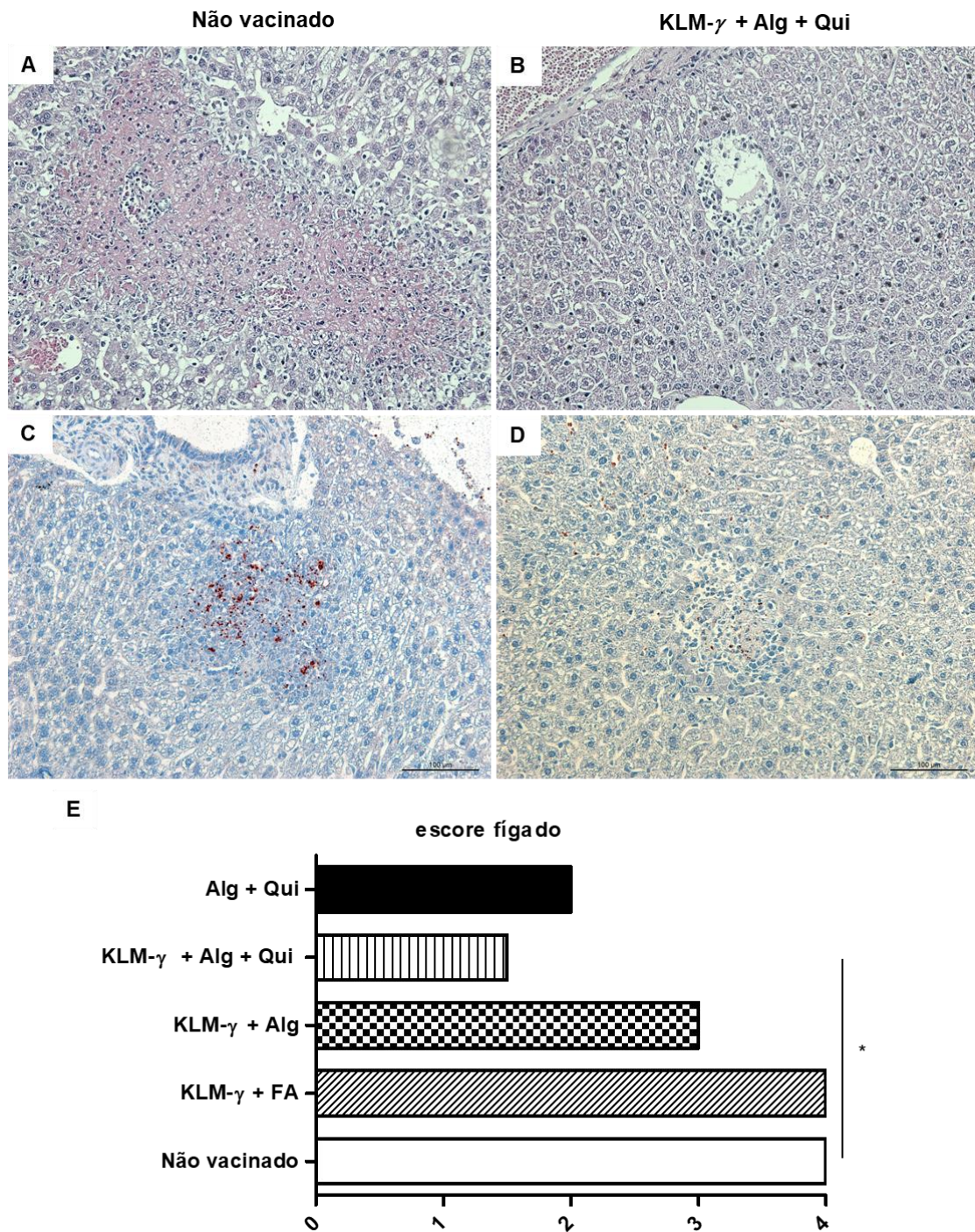


Figura 4 - Histopatologia hepática de camundongos vacinados e desafiados com dose subletal de *L. monocytogenes*. Camundongos (n = 5 ou 6) imunizados e desafiados com 1×10^5 *L. monocytogenes*/camundongo via intraperitoneal. No quarto dia após o desafio, o fígado de camundongos foi coletado e avaliado quanto à lesão inflamatória e necrose. O escore inflamatório foi dado de acordo com a intensidade das lesões: 0, ausência; 1, discreto; 2, moderado; 3, intenso. As áreas de necrose foram avaliadas com presença (1) ou ausência (0). (A) Necrose multifocal associada a intenso infiltrado neutrofílico em camundongos não vacinados infectados com *L. monocytogenes* (200

X); (B) Presença bacteriana de *L. monocytogenes* marcadas em vermelho no fígado de camundongos não vacinados infectados (200 X); (C) Pequenas áreas de necrose associado a infiltrado histiocítico multifocal discreto em camundongos vacinados com KLM- γ -alginato (200 X); (D) *L. monocytogenes* marcadas discretamente em vermelho em camundongos vacinados com KLM- γ -alginato; (200 X); (E) Avaliação de escore de fígado dos animais vacinados e desafiados com *L. monocytogenes* comparado com o grupo não vacinado. (* $p < 0,05$).

Vacina KLM- γ encapsulada alginato-quitosana melhora a sobrevivência de camundongos desafiados com dose letal de *L. monocytogenes*

Neste estudo, observamos que o tipo de adjuvante associado ao KLM- γ pode influenciar na colonização tecidual e na redução de lesões causadas pela infecção por *L. monocytogenes*. Assim, decidimos avaliar se as formulações vacinais de KLM- γ associadas a adjuvantes capazes em reduzir a carga bacteriana, também seriam capazes de proteger camundongos contra a dose letal de *L. monocytogenes*. Observamos que o adjuvante de Freund's, apesar de ser conhecido como indutor de resposta Th1, não foi capaz de proteger camundongos quando desafiado com dose letal de *L. monocytogenes*, com mortalidade de 100% dos camundongos no quarto dia de infecção. (Figura 5A). Por outro lado, camundongos vacinados com KLM- γ encapsulados com microcápsulas de alginato ou alginato-quitosana foram capazes de sobreviver, 30% e 60%, respectivamente, por até 14 dias. Além disso, os animais sobreviventes apresentaram recuperação de peso uma semana após o desafio, indicando recuperação clínica (Figura 5B). Estes resultados sugerem que o encapsulamento de *L. monocytogenes* gamma irradiada em alginato-quitosana protege contra a listeriose no modelo murino.

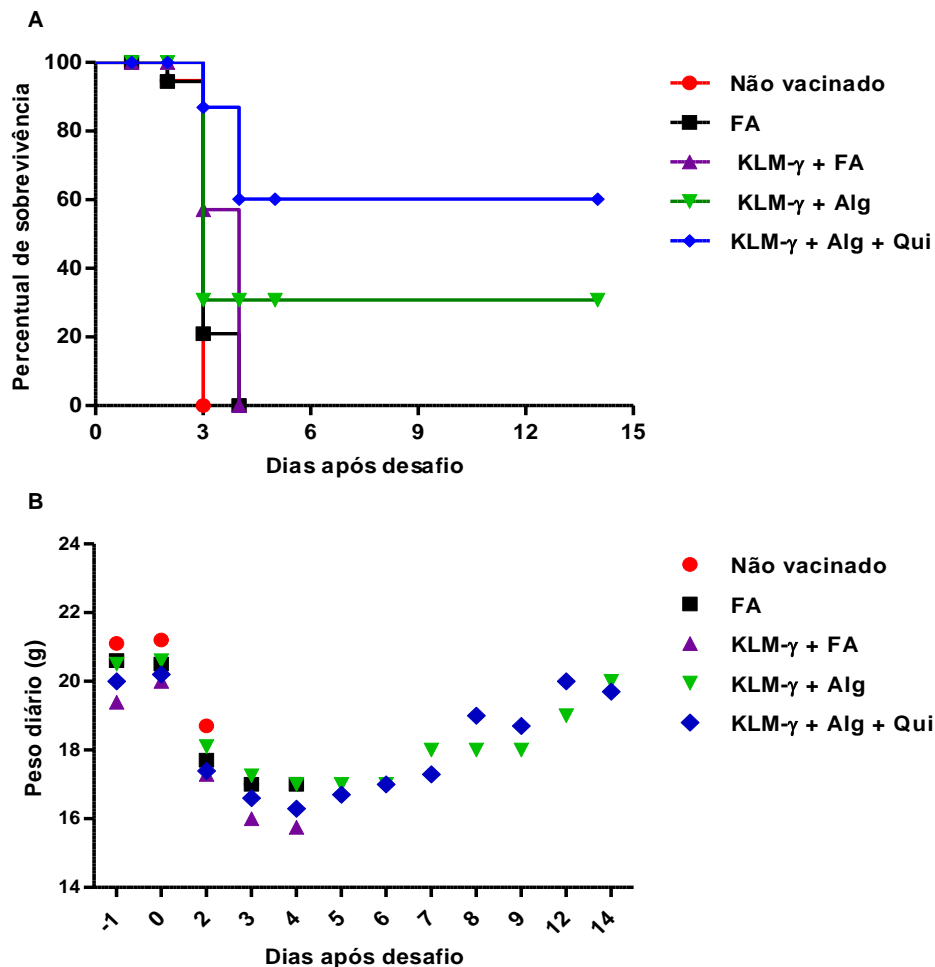


Figura 5 – Curva de sobrevivência e curva de ganho de peso de camundongos vacinados e desafiados com dose letal de *L. monocytogenes*. Dez camundongos Balb/c por grupo: não vacinados; vacinado com adjuvante de Freund (FA); KLM- γ com adjuvante de Freund (KLM- γ + FA); KLM- γ encapsulado com alginato (KLM- γ + Alg); O KLM- γ encapsulado com alginato-quitosana (KLM- γ + Alg + Qui) foram imunizados e desafiados com uma dose letal de 4×10^6 CFU/camundongo e observado por 14 dias. Os animais foram pesados com mortalidade registrada diariamente. (A) Curva de sobrevivência de camundongos vacinados e desafiados. Os dados são expressos como uma porcentagem de animais sobreviventes e foram submetidos ao teste Log-Rank ($p < 0,01$); (B) Peso diário de camundongos desafiados com dose letal de *L. monocytogenes*. O dia "0" representa o dia do desafio. Cada ponto representa o peso médio por grupo por 14 dias.

Ativação da resposta imune *in vitro* de esplenócitos de camundongos vacinados com KLM- γ associado às microcápsulas de alginato com ou sem quitosana.

Considerando o potencial vacinal do encapsulamento de KLM- γ , verificamos a resposta imune avaliando a proliferação celular e a produção de citocinas de esplenócitos de camundongos vacinados *in vivo* e estimulados *in vitro* (Figura 6). Observamos que após o

estímulo com KLM- γ , as células de memória de animais vacinados com microcápsulas de alginato e alginato-quitosana associadas foram capazes de responder a estímulos imunogênicos com aumento da proliferação celular (Figura 6A), além de produzir uma quantidade maior de IFN- γ e IL-10. (Figura 6B e C). A produção de citocinas foi significativamente maior nos grupos vacinados com KLM- γ associados às microcápsulas de alginato e alginato-quitosana em comparação ao grupo não vacinado ou vacinado apenas com microcápsulas vazias de alginato (Figura 6B e C).

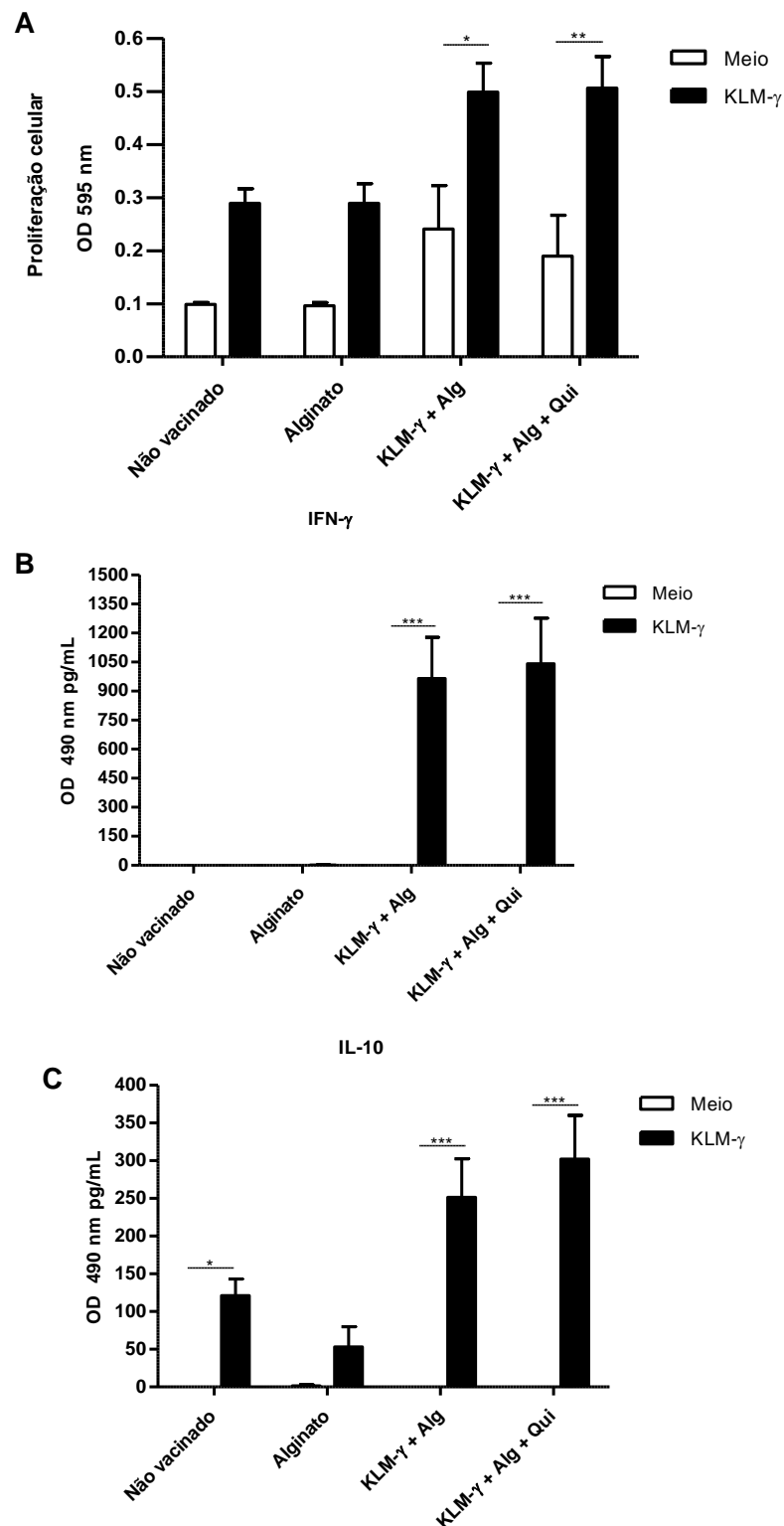


Figura 6 – Resposta imune de esplenócitos de camundongos Balb/c vacinados e estimulados com KLM- γ . Quatorze dias após a vacinação, os baços de camundongos ($n = 6$ ou 7) foram retirados assepticamente e os esplenócitos (5×10^5 células/poço) foram estimulados com RPMI (Meio) ou KLM- γ (1×10^9 UFC/mL) por 72 horas em duplicatas. A resposta proliferativa foi avaliada pelo

ensaio MTT. (A) Proliferação de esplenócitos estimulados com RPMI ou KLM- γ ; (B) Quantificação de IFN- γ e (C) IL-10 a partir de esplenócitos. O sobrenadante dos esplenócitos foi removido após 72 horas e os níveis de citocinas foram avaliados por ELISA. Os dados representam as médias e o desvio padrão. Os dados foram submetidos à ANOVA One-Way e comparados pelo teste de Tukey. (* p <0,05; ** p <0,01; * p <0,001).

DISCUSSÃO

Este estudo demonstra, pela primeira vez, que microcápsulas de alginato-quitosana foram capazes de melhorar a imunogenicidade de *L. monocytogenes* inativadas pela radiação gama, protegendo camundongos contra listeriose experimental, reduzindo a colonização bacteriana, lesão hepática e mortalidade causada por infecção por *L. monocytogenes*. Além disso, o ensaio *in vitro* demonstrou que o KLM- γ foi capaz de induzir a proliferação celular e a produção de citocinas nos esplenócitos de camundongos vacinados, demonstrando a capacidade de induzir resposta imune.

Pesquisas avaliaram vacinas de patógenos inativados por irradiação gama (Datta et al., 2006; Sanakkayala et al., 2005; David et al.; 2017). A irradiação gama, diferentemente de outros processos de inativação por calor ou química, preserva estruturas antigênicas da bactéria normalmente destruídas por outros métodos, tornando-a mais eficiente na indução de uma resposta imune protetora no modelo murino (Datta et al., 2006). Neste trabalho, a vacinação de camundongos apenas com KLM- γ não foi capaz de proteger camundongos desafiados por *L. monocytogenes*.

Em um estudo anterior de Datta e colaboradores, a vacinação de camundongos C57BL/6 usando *L. monocytogenes* inativados pela radiação gama foi capaz de estimular o sistema imunológico de camundongos, com redução da colonização bacteriana e aumento da sobrevivência, sem a necessidade de associação com adjuvantes. Camundongos da linhagem C57BL/6 são considerados mais resistentes à infecção por *L. monocytogenes* (Boyartchuk et al., 2001; D'Orazio et al., 2006). A escolha de modelos animais mais suscetíveis à infecção por *L. monocytogenes* é desejável, a fim de imitar as condições da doença humana, afetando principalmente indivíduos imunocomprometidos. Neste estudo, usamos a cepa Balb/c, considerada mais sensível à infecção por *L. monocytogenes* (Boyartchuk et al., 2001; D'Orazio et al., 2006).

Estudos tem demonstrado interesse em vacinas baseadas em nanopartículas preparadas com polímeros biodegradáveis e biocompatíveis porque eles não apresentam efeitos colaterais e residuais (Zhao et al., 2014). Neste estudo, associamos o antígeno KLM- γ com um

biopolímero que tem sido usado como adjuvante da vacina em modelos experimentais (Arenas-Gamboa et al., 2008; Silva et al., 2015a; Silva et al., 2015b). As microcápsulas de alginato impedem a degradação do antígeno e permite maior captura e apresentação do antígeno para células apresentadoras de antígeno do hospedeiro, promovendo a maturação das células dendríticas (Sarei et al., 2013; Li et al., 2013). A eficiência de encapsulamento de alginato pode ser melhorada pela associação de microcápsulas à quitosana (George e Abraham, 2006; Yu et al., 2009). Adicionalmente, foi descrito que a quitosana tem uma ação imunoestimuladora com a produção de citocinas Th1 quando aplicadas subcutaneamente (Heffernan et al., 2011). Em nosso estudo, o KLM- γ associado às microcápsulas de alginato-quitosana apresentou um índice protetor semelhante às microcápsulas de KLM- γ -alginato e também foi capaz de estimular a proliferação de esplenócitos e a produção de IFN- γ *in vitro*. Curiosamente, camundongos vacinados com KLM- γ -alginato-quitosana demonstraram maior sobrevivência na dose letal de *L. monocytogenes* e melhor índice de proteção vacinal (1,14). Além disso, o grupo apresentou menor intensidade de lesão hepática devido à infecção por *L. monocytogenes*. Estudos apontam para o efeito anti-inflamatório da quitosana quando utilizado em modelo experimental de fibrose hepática com redução das enzimas aspartato transaminase (AST), alanina transaminase (ALT) e fosfatase alcalina (ALP) (Wang et al., 2018). Quando utilizado em modelo de carcinoma hepatocelular induzido em ratos, a quitosana demonstrou possuir ação antioxidante e propriedades antilipídêmicas (Subhapradha et al., 2017).

Como esperado, a vacinação de camundongos com KLM- γ associado ao adjuvante de Freund's, mas não com hidróxido de alumínio, reduz a carga bacteriana nos tecidos de camundongos infectados com *L. monocytogenes*. O hidróxido de alumínio é amplamente utilizado em vacinas virais humanas comerciais (hepatite A e B e tétano), sendo considerado um adjuvante indutor da resposta imune Th2 e anticorpos neutralizantes (He et al., 2015). No entanto, a resposta imune do hidróxido de alumínio não foi protetora contra bactérias intracelulares (Sun et al., 2008), como *L. monocytogenes*. O adjuvante de Freund's, usado exclusivamente em estudos experimentais, é um adjuvante indutor de resposta imune celular tipo Th1 com produção de citocinas como IFN- γ (Shibaki e Katz, 2002), essencial para o controle de infecções por *L. monocytogenes*. (Calderon-Gonzalez, 2014).

Surpreendentemente, apesar da vacinação com KLM- γ associada ao adjuvante de Freund's ser eficaz na redução da carga bacteriana em camundongos infectados com *L. monocytogenes*, ela não foi capaz de reduzir os danos no fígado ou impedir a morte de

camundongos desafiados com a dose letal de *L. monocytogenes*, como observado em camundongos vacinados com KLM- γ encapsulado com alginato-quitosana. O estímulo exacerbado da resposta imune inflamatória pelo adjuvante de Freund's prejudica clinicamente os camundongos vacinados. Trata-se de um adjuvante irritante, capaz de estimular a alta produção de IFN- γ pelas células natural killer (NK) (Victoratos et al., 1997). Além disso, a ativação exacerbada de células NK com superexpressão de IFN- γ , induzida pela dose letal de *L. monocytogenes*, impede a resposta antibacteriana do hospedeiro, limitando a mobilização de granulócitos aos locais de infecção, tornando-o suscetível a *L. monocytogenes* (Viegas et al., 2013).

CONCLUSÃO

A imunização de camundongos com KLM- γ encapsulada com microcápsulas de alginato-quitosana são capazes de reduzir a colonização bacteriana com menor alteração hepática, estimulando a resposta imune e prevenindo a mortalidade por listeriose no modelo murino. Este estudo demonstrou que *L. monocytogenes* gama irradiada pode ser uma ferramenta importante para o desenvolvimento de vacinas seguras contra a listeriose e, que as microcápsulas de alginato-quitosana, funcionam como potenciais adjuvantes vacinais quando associados a bactérias gamma irradiadas.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

1. Abram M, Schlüter D, Vuckovic D, Wraber B, Doric M, Deckert M. Murine model of pregnancy-associated *Listeria monocytogenes* infection. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2003; 35:177-182.
2. Abram M, Schlüter D, Vuckovic D, Waber B, Doric M, Deckert, M. Effects of pregnancy-associated *Listeria monocytogenes* infection: necrotizing hepatitis due to impaired maternal immune response and significantly increased abortion rate. *Virchows Arch* 2002; 441:368–379.
3. Allam M, Tau N, Smouse SL, Mtshali PS, Mnyameni F, Khumalo ZTH, et al. Whole-genome sequences of *Listeria monocytogenes* sequence type 6 isolates associated with a large foodborne outbreak in South Africa, 2017 to 2018. *Genome Announc* 2018. 6:e00538-18. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00538-18>.
4. Arca HC, Gunbeyaz M, Senel S. Chitosan-based systems for the delivery of vaccine antigens. *Expert Rev Vaccines* 2009; 8:937–953.
5. Arenas-Gamboa AM, Ficht TA, Kahl-Mcdonagh MM, Rice-ficht AC. Immunization with a single dose of a microencapsulated *Brucella melitensis* mutant enhances protection against wild-type challenge. *Infect Immun* 2008; 76:2448-2455.
6. Arenas-Gamboa M, Ficht TA, Davis DS, Elzer PH, Wong-Gonzalez A, Rice-Ficht AC. Enhanced immune response of red deer (*Cervus elaphus*) to live RB51 vaccine strain using composite microspheres. *J. Wild. Dis* 2009; 45:165-173.
7. Baudner BC, Morandi M, Giuliani MM, Verhoef JC, Junginger HE, Costantino P, et al. Modulation of immune response to group C meningococcal conjugate vaccine given intranasally to mice together with the LTK63 mucosal adjuvant and the trimethyl chitosan delivery system. *J Infect Dis* 2004; 189(5):828-32.
8. Borges O, Silva M, de Sousa AD, Borchard G, Junginger HE, Cordeiro-da-Silva A. Alginate coated chitosan nanoparticles are an effective subcutaneous adjuvant for hepatitis B surface antigen. *Int Immunopharmacol* 2008; 8 (13-14):1773-80.
9. Borucki MK, Call DR. *Listeria monocytogenes* serotype identification by PCR. *J Clin Microbiol* 2003;41(12):5537-5540. doi:10.1128/jcm.41.12.5537-5540.2003.
10. Boyartchuk VL, Broman KW, Mosher RE, D'Orazio SE, Starnbach MN, Dietrich WF. Multigenic control of *Listeria monocytogenes* susceptibility in mice. *Nat Genet* 2001;27(3):259-60.

11. Buchrieser C, Rusniok C, Garrido P, Hain T, Scotti M, Lampidis R, et al. Complete genome sequence of the animal pathogen *Listeria ivanovii*, which provides insights into host specificities and evolution of the genus *Listeria* *J Bacteriol* 2011; 193: 6787-6788.
12. Bueter CL, Lee CK, Wang JP, Ostroff GR, Specht CA, Levitz SM. Spectrum and mechanisms of inflammasome activation by chitosan. *J Immunol* 2014; 192(12):5943-51. doi: 10.4049/jimmunol.1301695.
13. Calderon-Gonzalez R, Teran-Navarro H, Frande-Cabanes E, Ferrandez-Fernandez E, Freire J, Penades S, et al. Pregnancy Vaccination with Gold Glyco-Nanoparticles Carrying *Listeria monocytogenes* Peptides Protects against Listeriosis and Brain and Cutaneous-Associated Morbidities. *Nanomaterials* 2016; 6: 151.
14. Calderon-González R, Frande-Cabanes E, Bronchalo-Vicente L, Lecea-Cuello MJ, Pareja E, Bosch-Martínez A, et al. Cellular vaccines in listeriosis: role of the *Listeria* antigen GAPDH. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 2014; 4-22.
15. Calderon-Gonzalez R, Tobes R, Pareja E, Frande-Cabanes E, Alaez-Alvarez L, Petrovsky N, et al. Identification and characterisation of T-cell epitopes for incorporation into dendritic cell-delivered *Listeria* vaccines. *J Immunol Methods* 2015; 9: 111–119.
16. Carroll EC, Jin L, Mori A, Munoz-Wolf N, Oleszycka E, Moran HB, et al. The Vaccine Adjuvant Chitosan Promotes Cellular Immunity via DNA Sensor cGAS-STING-Dependent Induction of Type I Interferons. *Immunity* 2016; 44(3):597-608. doi: 10.1016/j.immuni.2016.02.004.
17. Carvalho, T. F.; Haddad, J. P. A.; Paixao, T. A.; Santos, R. L. (2016). Meta-analysis and advancement of brucellosis vaccinology. *PloS one*, 11(11).
18. Centers for Disease Control and Prevention/CDC. Disponível in: <https://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/index.html>.
19. Datta SK, Okamoto S, Hayashi T, Shin SS, Mihajlov I, Fermin A, et al. Vaccination with irradiated *Listeria* induces protective T cell immunity. *Immunity* 2006; 25: 143–152.
20. D'Orazio SE, Troese MJ, Starnbach MN. Cytosolic localization of *Listeria monocytogenes* triggers an early IFN-gamma response by CD8⁺ T cells that correlates with innate resistance to infection. *J Immunol* 2006; 177(10):7146-54.
21. European Centre for Disease Prevention and Control. Disponível in: https://ecdc.europa.eu/sites/portal/files/documents/RRA-Listeria-monocytogenes-2017_0.pdf.

22. George M, Abraham DJ. Polyionic hydrocolloids for the intestinal delivery of protein drugs: alginate and chitosan—a review. *J Control Release* 2006;114(1):1–14.
23. Gong Y, Tao L, Wang F, Liu W, Jing L, Liu D, et al. Chitosan as an adjuvant for a *Helicobacter pylori* therapeutic vaccine. *Mol Med Rep* 2015; 12(3):4123-4132. doi: 10.3892/mmr.2015.3950.
24. Griffiths KL, Khader SA. Novel vaccine approaches for protection against intracellular pathogens. *Current opinion in immunology* 2014; 28:58–63.
25. He P, Zou Y, Hu Z. Advances in aluminum hydroxide-based adjuvant research and its mechanism. *Hum Vaccin Immunother* 2015;11(2):477–488. doi:10.1080/21645515.2014.1004026.
26. Heffernan MJ, Zaharoff DA, Fallon JK, Schlom J, Greiner JW. *In vivo* efficacy of a chitosan/IL-12 adjuvant system for protein-based vaccines. *Biomaterials* 2011; 32, 926–932.
27. Ito SI, Ishii KJ, Shirota H, Klinman D M. CpG oligodeoxynucleotides improve the survival of pregnant and fetal mice following *Listeria monocytogenes* infection. *Infection and immunity.*, 2004; 72(6): 3543-3548.
28. Kimura Y, Okuda H. Prevention by chitosan of myelotoxicity, gastrointestinal toxicity and immunocompetent organic toxicity induced by 5-fluorouracil without loss of antitumor activity in mice. *Jpn J Cancer Res* 1999;90(7):765-74.
29. Lauvau G, Vijh S, Kong P, Horng T, Kerksiek K, Serbina N, et al. Priming of memory but not effector CD8⁺ T cells by a killed bacterial vaccine. *Science* 2001; 294:1735–1739.
30. Low JC, Donachie W. A Review of *Listeria monocytogenes* and Listeriosis. *Vet J* 1997; 153:9-29.
31. National Institute for Communicable Disease/NICD, 2018. http://www.nicd.ac.za/wp-content/uploads/2018/05/Listeriosis-outbreak-situation-report-draft-_27April-2018_fordistribution.pdf.
32. Nightingale KK, Schukken YH, Nightingale CR, Fortes ED, Ho AJ, Her Z, et al. Ecology and Transmission of *Listeria monocytogenes* Infecting Ruminants and in the Farm Environment. *Appl Environm Microbiol* 2004; 70:4458–4467.
33. Noordhout M-de-C, Devleesschauwer B, Angulo FJ, Verbeke G, Haagsma J, Kirk M, et al. The global burden of listeriosis: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis* 2014;14:1073–1082.

34. Orsi RH, den Bakker HC, Wiedmann M. *Listeria monocytogenes* lineages: Genomics, evolution, ecology, and phenotypic characteristics. *Int J Med Microbiol* 2011;301(2):79-96. doi: 10.1016/j.ijmm.2010.05.002.
35. Posfay-Barbe KM, Wald ER. Listeriosis. *Seminars in fetal e neonatal medicine* 2009; 14:228-233.
36. Pouillot, R., Klontz, K. C., Chen, Y., Burall, L. S., Macarisin, D., Doyle, M., ... & Van Doren, J. M. Infectious dose of *Listeria monocytogenes* in outbreak linked to ice cream, United States, 2015. *Emerging infectious diseases.*, 2016;. 22(12): 2113.
37. Rachmilewitz D, Katakura K, Karmeli F, Hayashi T, Reinus C, Rudensky B, et al. Toll-like receptor 9 signaling mediates the anti-inflammatory effects of probiotics in murine experimental colitis. *Gastroenterology* 2004; 126, 520–528.
38. Rahaiee S, Shojaosadati SA, Hashemi M, Moini S, Razavi SH. Improvement of crocin stability by biodegradable nanoparticles of chitosan-alginate. *Int J Biol Macromol* 2015; 79, 423–432.
39. Rio ER-D, Marradi M, Calderon-Gonzalez R, Frande-Cabanes E, Penadés S, Petrovsky N, et al. A gold glyco-nanoparticle carrying a listeriolysin O peptide and formulated with Advax™ delta inulin adjuvant induces robust T-cell protection against listeria infection. *Vaccine* 2015; 33: 1465–1473.
40. Sarei F, Dounighi NM, Zolfagharian H, Khaki P, Bidhendi SM. Alginate Nanoparticles as a Promising Adjuvant and Vaccine Delivery System. *Indian J Pharm Sci* 2013;75(4):442-449.
41. Shibaki A, Katz SI. Induction of skewed Th1/Th2 T-cell differentiation via subcutaneous immunization with Freund's adjuvant. *Exp Dermatol* 2002;11(2):126-134.
42. Silva AP, Macêdo AA, Silva TM, Ximenes LC, Brandão HM, Paixão TA, et al. Protection provided by an encapsulated live attenuated $\Delta abcBA$ strain of *Brucella ovis* against experimental challenge in a murine model. *Clin Vaccine Immunol* 2015a; 22:789–97.
43. Silva APC, Macêdo AA, Costa LF, Rocha CE, Garcia LNN, Farias JRD, et al. Encapsulated *Brucella ovis* lacking a putative ATP-binding cassette transporter ($\Delta abcBA$) protects against wild type *Brucella ovis* in Rams. *PLoS One* 2015b;10:e0136865.
44. Snapir YM, Vaisbeinn E, Nassar F. Low virulence but potentially fatal outcome *Listeria ivanovii*. *Europ J Inter Medic* 2006; 17:286–287.

45. Subhapradha N, Shanmugam V, Shanmugam A. Chitosan nanoparticles from marine squid protect liver cells against N-diethylnitrosoamine-induced hepatocellular carcinoma. *Carbohydr Polym* 2017;171:18-26. doi: 10.1016/j.carbpol.2017.04.097.
46. Vázquez-Boland J-A, Kuhn M, Berche P, Chakraborty T, Domínguez-Bernal G, Goebel, et al. *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. *Clin Microbiol* 2001; 14:584–640.
47. Von Koenig WCH, Finger H. Failure of killed *Listeria monocytogenes* vaccine to produce protective immunity. *Nature* 1982; 297:233-234.
48. Wang F, Yang S, Yuan J, Gao Q, Huang C. Effective method of chitosan-coated alginate nanoparticles for target drug delivery applications. *J Biomater Appl* 2016; 31(1):3-12. doi: 10.1177/0885328216648478.
49. Wiedmann M, Bruce JL, Keating C, Johnson AE, McDonough PL, Batt CA. Ribotypes and virulence gene polymorphisms suggest three distinct *Listeria monocytogenes* lineages with differences in pathogenic potential. *Infect Immun*. 1997; 65(7):2707-2716.
50. World Health Organization, 2019. <https://www.who.int/csr/don/16-september-2019-listeriosis-spain/en/>
51. Yu CY, Yina, B-C, Zhang W, Cheng S-X, Zhang X -Z, Zhuo RX. Composite microparticle drug delivery systems based on chitosan, alginate and pectin with improved pH-sensitive drug release property. *Coll surfaces B: Bioint* 2009; 68:245-249.
52. Zlatkovic J, Tsouchnikas G, Jarmer J, Koessl C, Stiasny K, Heinz FX. Aluminum hydroxide influences not only the extent but also the fine specificity and functional activity of antibody responses to tick-borne encephalitis virus in mice. *J Virol* 2013;87(22):12187-95. doi: 10.1128/JVI.01690-13.

CAPÍTULO III

Construção de proteína quimérica constituída de epítomos preditos de *L. monocytogenes* candidata a vacina contra listeriose em modelo murino

INTRODUÇÃO

Listeriose é uma doença bacteriana provocada por *Listeria monocytogenes* e transmitida via alimento (“*food borne disease*”), que acomete principalmente indivíduos imunossuprimidos, idosos, mulheres gestantes, e crianças (Abram et al., 2002). Nos Estados Unidos é a terceira doença de origem alimentar responsável por causar hospitalizações com altas taxas de letalidade (20%) das pessoas envolvidas (Cruz et al., 2008). As manifestações clínicas neurológicas e reprodutivas são as formas mais graves da doença, sintomas que também são observados nos pequenos e grandes ruminantes infectados (Vázquez-Boland et al, 2001).

Atualmente, são reconhecidas 18 espécies do gênero *Listeria*: *L. monocytogenes*, *L. seeligeri*, *L. ivanovii*, *L. welshimeri*, *L. marthii*, *L. innocua*, *L. grayi*, *L. fleischmannii*, *L. floridensis*, *L. aquatica*, *L. newyorkensis*, *L. cornellensis*, *L. rocourtiae*, *L. weihenstephanensis*, *L. grandensis*, *L. riparia*, *L. booriae* (Orsi e Wiedmann, 2016) e *L. costaricensis* (Núñez-Montero et al., 2018). A espécie mais patogênica e a principal responsável por causar doença em humanos e animais é *L. monocytogenes* (Vázquez-Boland et al, 2001). Embora, *Listeria ivanovii* seja também capaz de causar doença em ruminantes (Chand e Sadana, 1999; Hofer et al., 2000) com alguns relatos da doença em humanos (Snapir et al. 2006; Guillet et al. 2010).

De acordo Ivanek e colaboradores (2004), apesar do aumento de surtos de listeriose em todo o mundo e do impacto na saúde pública e economia considerável para a indústria de alimentos provocada pela doença, às medidas preventivas de controle bacteriano são voltadas apenas para os alimentos, com notificação obrigatória ocorrendo apenas em alguns países do continente Europeu, Africano e da América do Norte.

A dificuldade da produção de vacinas contra patógenos intracelulares se baseia no estilo de vida intracelular do microorganismo com a imunidade protetora dependente de resposta mediada por linfócitos T seja CD4⁺ ou CD8⁺ (Griffiths e Khader, 2014). Assim, um dos maiores desafios é a geração de uma resposta de células T de memória apropriada, localizadas no local de predileção do patógeno, garantindo a eliminação do agente de forma segura para o hospedeiro (Griffiths e Khader, 2014).

Vacinas consideradas seguras são as vacinas inativadas, ou constituídas de DNA do patógeno, ou de peptídeos, ou de proteínas recombinantes. Algumas vacinas contendo peptídeos imunogênicos específicos de *L. monocytogenes* têm sido descritas contra listeriose, incluído de listeriolisina O (LLO) (Kono et al., 2012; Calderon-Gonzalez, 2015; Calderón-Gonzalez et al, 2016) e Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH) (Calderon-Gonzalez, 2014; Calderon-Gonzalez, 2015; Calderón-Gonzalez et al, 2016; Calderón-Gonzalez et al, 2017). Por se tratar de vacinas proteicas, o uso de adjuvantes é fundamental para estímulo da resposta Th1.

A utilização de ferramentas de bioinformática analisando múltiplos genomas associado à tecnologia sequencial deu origem a um novo conceito de construção de vacinas constituídas de DNA recombinante. A predição *in silico* calcula, por afinidade, quais epítomos de um antígeno se ligam as moléculas do complexo de histocompatibilidade (MHC) do hospedeiro. Analisando e organizando as informações de dados computacionais e matemáticos, os dados imunológicos em larga escala, para serem interpretadas de maneira imunologicamente significativas (Soria-Guerra et al., 2015).

A construção da proteína quimérica é formada por peptídeos preditos considerados imunogênicos, potencialmente imunoprotetores, que serão fundidos em uma única molécula, a ser processada e reconhecida pelos receptores de células TCD4⁺ e TCD8⁺ (Soria-Guerra et al., 2015).

Desta forma, propomos a construção de uma proteína quimérica formada apenas por peptídeos imunogênicos preditos de *L. monocytogenes* para uso vacinal. A proteína quimérica associada a um forte adjuvante indutor de resposta Th1 poderá resultar em uma candidata vacinal, eficaz e segura. Inicialmente, testada em camundongo, considerado modelo de escolha para o estudo de resposta imune contra listeriose (Drevets e Bronze, 2008; Hoelzer et al., 2012, D’Orazio et al., 2014). Como prova de conceito, para testar esta hipótese, produzimos uma proteína quimérica formada por uma sequência de 22 peptídeos oriundos de proteínas de *L. monocytogenes* preditos *in silico* como epítomos de célula T de camundongos.

MATERIAL E MÉTODOS

Cepas bacterianas, plasmídeos e condições de cultivo

O cultivo e manipulação bacteriana foram realizados no Laboratório de Patologia Molecular de biossegurança nível 2 da Escola de Veterinária da UFMG.

Cepas bacterianas utilizadas neste estudo incluem *Escherichia coli* XL-1Blue (Phoneutria, Brasil) e *E. coli* BL21 Star [F- ompT hsdSB (rB- mB-) gal dcm rne131 (DE3)] (Phoneutria, Brasil). *E. coli* cepa XL-1Blue foi usada para clonagem do plasmídeo pPRQ e *E. coli* BL21 (DE3) utilizada para a expressão da proteína. Cepas de *E. coli* foram cultivadas à 37°C em ágar ou caldo Luria-Bertani (LB) (triptona 1%, extrato de levedura 0,5% e NaCl 1%) suplementado quando requerido com canamicina (100 µg/mL, Gibco, EUA).

O plasmídeo utilizado neste estudo foi o pET28a (+) (EMD Bioscience, EUA) contendo um gene artificial codificador de uma proteína quimérica recombinante de *L. monocytogenes* LM22QR ligada a sequência de 6 histidinas (6xHis) na sua porção carboxi-terminal, denominado de PRQLM (Genscript, EUA). O plasmídeo contém o gene de resistência a canamicina.

Amostras da cepa de *L. monocytogenes* sorotipo 4b (ATTC 19115), utilizada no experimento de proteção em camundongos, foram cultivadas em 10 mL de caldo BHI (*Brain Heart Infusion*, Kasvi, EUA) à 37°C por 15 horas sob agitação a 200 rpm. O pré-inóculo bacteriano foi ajustado para uma concentração de 1×10^8 UFC/mL, determinada por espectrofotometria (SmartSpec Plus, Bio-Rad, EUA) em uma densidade óptica de 600 nm, e 500 µL do pré inóculo foi adicionado a um novo meio de cultivo BHI de 10 mL a 37°C, por aproximadamente 3 horas, sob agitação a 200 rpm até atingir uma concentração de 1×10^9 UFC/mL.

Predição *in silico* de epítomos para células T de proteínas de *Listeria* spp.

Sequências do genoma completo de *Listeria* spp. foram selecionadas de acordo com as espécies capazes de causar doença em humanos e/ou animais obtidas no GenBank e NCBI (*National Center for Biotechnology Information* - <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) (Tabela 3). A predição ocorreu por meio da análise completa dos genomas e também de proteínas imunogênicas de *Listeria* sp. com sequência de aminoácidos obtidas no GenBank (Tabela 4).

As sequências foram disponibilizadas para um servidor no Laboratório de Imunologia e Genômica de Parasitos (LIGP) no Departamento de Parasitologia do Instituto de ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (ICB/UFMG).

Tabela 3 – Referências das cepas de *Listeria* depositadas no NCBI selecionadas para predição imunogênica.

Bactéria	Referência da sequência
<i>Listeria monocytogenes</i> EGD-e cromossomo	NC_003210.1
<i>Listeria monocytogenes</i> EGD	NC_022568.1
<i>Listeria monocytogenes</i> Clip80459 sorotipo 4b	NC_012488.1
<i>Listeria monocytogenes</i> sorotipo 1/2a str. 08-6569	NZ_CP006858.1
<i>Listeria ivanovii</i> WSLC3009	NZ_CP007172.1

Tabela 4 – Proteínas imunogênicas selecionadas para predição *in silico*.

Proteína	GenBank
Proteína p60	ABI51620.1
Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH)	CWW15582.1
Listeriolisina O (LLO)	KKO43736.1
Internalina A	CAC20628.1
ActA	AAS84786.1
Ivanolisina	CAA42995.2

Análise *in silico* para predição para epítomos específicos para receptor MHC (moléculas do complexo principal de histocompatibilidade) de classe I de linfócitos T CD8⁺ de camundongo foram realizados pelo programa netMHC (3.4), por triagem manual, levando em consideração os epítomos a serem preditos para os seis alelos de camundongos Balb/c (H-2-Kd, H-2-Dd, H-2-Db, H-2-Ld, H-2-Kk, H-2-Kb).

A análise *in silico* para a predição de epítomos para receptor MCH de classe II de linfócito T CD4⁺ foi realizada usando o programa netMHCII 2.2 *server* (Nielsen et al., 2009), também por uma triagem manual, avaliando dois alelos de camundongos (H-2-IAb, H-2-IAd)

Construção do plasmídeo para expressão da proteína quimérica recombinante

Os peptídeos preditos como epítomos de MHC I e de MHC II oriundos de proteínas sabidamente imunogênicas e extraídos do genoma completo de *Listeria* sp. que apresentaram escore de afinidade de ligação, foram selecionados para a construção da proteína.

Após uma análise de sobreposição dos peptídeos selecionados, na qual se compara peptídeos com regiões em comum, foram fusionados, criando-se peptídeos únicos. Peptídeos

repetidos para MHC I e MHC II foram excluídos, com a sequência da proteína recombinante construída com 22 peptídeos únicos preditos e contendo 331 aminoácidos unidos por uma sequência ligante de glicina (3xGli) entre cada epítipo, e iniciada com um metionina. A sequência de nucleotídeos da proteína recombinante foi analisada para otimização dos códons disponível em: http://www.ebi.ac.uk/Tools/st/emboss_backtranseq/. A sequência otimizada para expressão em *E. coli*, denominada LM22QR, foi sintetizada comercialmente (Genscript). A sequência foi clonada no vetor PET28a (+) gerando o plasmídeo PRQLM (Genscript). Na construção deste plasmídeo, após análise de sítios de restrição (Neb cutter nc2.neb.com), a inserção do gene sintético codificador da proteína quimérica recombinante LM22QR ocorreu entre os sítios das enzimas NcoI e XhoI, fusionado a cauda de histidina c-terminal e ao um códon finalizador TAG. Dois nucleotídeos GG foram adicionados ao início da sequência da LM22QR para manter o frame com o códon ATG do plasmídeo localizado no sítio de restrição NcoI. A sequência correta da construção foi confirmada pela empresa (Genscript).

Transformação em *Escherichia coli*

O plasmídeo PRQLM contendo a sequência de nucleotídeos da proteína LM22QR foi clonado em *E. coli* eletrocompetentes da linhagem XL-1Blue e BL21 (DE3) para clonagem do plasmídeo e expressão de proteína recombinante, respectivamente.

Para transformação 40 µL de *E. coli* eletrocompetente foram adicionados a 1 µL de plasmídeo e homogeneizados gentilmente. Em seguida as amostras foram transferidas para cubetas de eletroporação de 0,1 cm (Bio-Rad, USA), e submetidas a um pulso de 1,8 kV. Após a eletroporação, foi adicionado 1 mL de SOC (2% de tripton, 0,5% de extrato de levedura, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄ e 20 mM glicose) e transferido para um microtubo, seguido por incubação 37°C sob agitação a 200 rpm por 1 hora. Após a incubação, a amostra foi plaqueada em meio sólido LB (10 g/L de tripton, 5 g/L de extrato de levedura, 10 g/L de NaCl, 15 g/L de ágar bacteriológico), contendo 100 µg/mL de canamicina (Gibco, EUA), e incubada a 37°C por 24 horas. Colônias cultivadas em ágar LB contendo canamicina foram selecionadas e armazenadas -80°C.

Expressão da proteína LM22QR em *Escherichia coli*

E. coli BL21 (DE3) contendo o plasmídeo PRQLM congelada foi semeada em meio ágar LB com canamicina (100 µg/mL), e incubada a 37°C com 5% de CO₂ por 24 horas. Uma colônia isolada de bactéria foi inoculada em 50 mL de meio de cultura LB contendo

canamicina (100 µg/mL) e incubada a 37°C sob agitação de 180 rpm por 16 horas. Após esse período, o inóculo foi diluído na proporção de 1:20 em 1.000 mL de LB com canamicina (100 µg/mL) e incubada a 37°C, 220 rpm até atingir a densidade óptica 6000 (0,6-0,8), mensurada por espectrofotômetro (SmartSpec, Bio-Rad, EUA). Para indução da expressão da proteína, após atingir densidade óptica desejada, foram adicionados 1mM de isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG, Invitrogen, EUA) a 30°C sob agitação a 220 rpm por 4 horas. Após as 4 horas de indução, a cultura foi centrifugada a 4.000 g por 30 minutos a 4°C na centrífuga 5810R (Eppendorf, Alemanha) e, em seguida, armazenada a -80°C. Alíquotas da cultura antes da adição de IPTG, e após o período de indução foram coletadas e congeladas para utilização como controle de expressão. Amostras de *E. coli* BL21 vazia (sem o plasmídeo) não induzida e induzida foram também adicionadas como controles. Todas as alíquotas foram analisadas por eletroforese de gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS/PAGE). Alíquota de *E. coli* BL21 induzida também foi coletada para realizar o teste de solubilidade da proteína LM22QR.

Teste de solubilidade proteína quimérica LM22QR

Após a indução, foi coletado 1 mL da cultura para o teste de solubilidade e adicionada Lisozima (Sigma, EUA) a 100 µg/mL. A suspensão foi submetida a 10 ciclos de congelamento em nitrogênio líquido e descongelamento em banho-maria à 37°C e 10 passagens em seringa de insulina (1 mL, 26G, 0,45x13 mm, BD, Bélgica). A amostra foi centrifugada por 10 minutos a 11.000 g, para a separação da fração solúvel (sobrenadante) e insolúvel (sedimento). A fração insolúvel da amostra foi ressuspensa em 150 µL de água Milli-Q. As frações obtidas da amostra foram analisadas em SDS/PAGE objetivando avaliar em qual fração se encontrava a proteína recombinante.

Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS/PAGE)

Vinte µL de suspensões bacterianas induzidas e não induzidas ou lisadas e fracionadas foram adicionados a 5 µL de tampão de amostra SDS (dodecil sulfato de sódio) (25% de solução a 0,5 M Tris-HCl - Invitrogen, EUA, pH 6,8; 20% de glicerol; 4% de betamercaptoetanol; 0,2% de azul de bromofenol; 4% de SDS). As amostras foram aquecidas a 100°C por 5 minutos e submetidas em seguida ao SDS-PAGE. Foram utilizados 20 µL de marcador de peso molecular para proteína (SeeBlue™ Plus2, Invitrogen). Para o SDS-PAGE, inicialmente, preparou-se o gel de separação a 12% utilizando acrilamida 30% (29% de

acrilamida - Invitrogen, 1% N,Nmetileno-bis-acrilamida - Invitrogen) 1,5 M Tris-HCl pH 8,8 (Invitrogen), SDS 10%, persulfato de amônio 10% e 0,05% de Tetrametiletilenediamine UltraPure (TEMED) (Invitrogen). Em seguida, o gel de concentração a 4% foi preparado de modo semelhante ao gel de separação, porém utilizando o tampão Tris-HCl 1,0 M com pH de 6,8.

A eletroforese ocorreu em tampão de corrida Tris-glicina pH 8,0 (Tris 25 mM, Glicina 0,25 mM, SDS 0,1%) sob à voltagem de 80 V por 40 minutos e, em seguida, a voltagem era alterada para 115 V por aproximadamente 2 horas a uma tensão constante de 110V. Após a corrida, o gel foi corado por solução de azul de Coomassie (Coomassie Brilliant Blue G-250 0,25%, metanol 50% e ácido acético 10%) por 16 horas e descorado em solução de etanol 10% e ácido acético 5%.

Purificação de proteína quimerica LM22QR

A proteína recombinante contendo cauda de 6xHis foi purificada usando cromatografia de afinidade por íons de Níquel (Ni^{2+}) conjugados com quelante de Sepharose e solubilizada em 8 M de ureia. O sedimento da suspensão bacteriana obtido após a etapa da indução de expressão foi ressuspensionado em 50 mL (para cada 1.000 mL de cultura) de tampão de lise [PBS contendo 30 mM de imidazol (Sigma-Aldrich), 8 M de ureia, lisozima 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Sigma-Aldrich)]. Em seguida, o extrato foi lisado no sonicador (Sonics Vibra-Cell VC130, American Laboratory Trading, EUA), realizando 10 ciclos (40% de potência) de 1 minuto intercalando com banho de gelo por 1 minuto. O lisado foi centrifugado a 4.000 g a 4°C por 30 minutos e o sobrenadante (fração solúvel) foi coletado e filtrado com filtro de seringa 0,45 μm . O lisado filtrado foi então purificado por cromatografia de afinidade no sistema AKTAPrime (GE Healthcare, EUA), utilizando coluna de afinidade His Trap HP (5 mL, GE Healthcare). A coluna foi previamente lavada com solução de tampão A (PBS contendo 30 mM de imidazol) e a eluição foi feita com tampão B (PBS contendo imidazol 500 mM). As frações obtidas em toda a extensão do pico de absorvância, observadas na eluição, foram mantidas a uma temperatura de 4°C e analisadas quanto à integridade e pureza da proteína por SDS-PAGE.

Após purificação, a proteína eluída em solução tampão, contendo 8 M de uréia, é lavada com tampão PBS através do sistema AKTAPrime (GE Healthcare) utilizando a coluna Hiprep Desalting 53 mL (GE Healthcare). Alíquotas das frações obtidas neste processo foram também avaliadas por SDS-PAGE. Ao final de todo o procedimento as proteínas foram

mantidas a 4°C, até o momento de uso. As concentrações proteicas das amostras purificadas foram dosadas pelo método colorimétrico do ácido Bicinconínico (BCA) utilizando o kit BCA Protein Assay (Thermo Scientific, EUA) seguindo as instruções do fabricante.

Western blot da proteína recombinante quimérica

A confirmação da expressão da proteína recombinante foi feita através do *Western blot* utilizando o anticorpo anti-cauda 6xHis. Alíquotas de lisado bruto de *E. coli* BL21: vazia não induzida (V-NI); vazia induzida (V-I); contendo o plasmídeo PRQLM não induzida (P-NI); contendo o PRQLM induzida (P-I) e amostra de proteína recombinante purificada foram adicionadas ao tampão de amostra SDS e submetidas ao SDS-PAGE.

As amostras foram transferidas para membranas de polyvinylidene difluoride (PVDF) com microporos de 45 µm (Immobilon®-P, Millipore, EUA), a 115 V, 350 mA por 1 hora a 4°C, utilizando o sistema Mini Trans-Blot (BioRad), imersas em tampão de transferência contendo 48 mM de Tris base, 39 mM de glicina, 20% v/v de álcool metílico. A membrana foi incubada por 1 hora, sob agitação em solução de bloqueio, contendo: Tris tampão salina (TBS) (50 mM tris, 150 mM NaCl e pH 7,5) adicionado 0,1% de Tween-20 (solução TBS-T), contendo 5% de leite desnatado em pó (Molico, Brasil). Após o bloqueio, realizou-se três lavagens da membrana com TBS-T por 5 minutos e, em seguida, a membrana foi incubada com anticorpo primário monoclonal 6xHis *epitope tag Antibody* (Thermo Scientific, EUA) na diluição 1:3.000 em solução de TBS-T contendo 2% de leite desnatado em pó, por 18 horas a 4°C, sob agitação. A membrana foi lavada três vezes com TBS-T e incubada com anticorpo secundário anti-mouse IgG (Sigma-Aldrich) na diluição 1:2.000 por 1 hora a temperatura ambiente sob agitação. Após três novas lavagens da membrana com solução TBS-T, realizou-se a revelação com DAB (3,3'-diaminobenzidina, Dako, EUA), seguida pela parada da revelação, adicionando água destilada.

Vacinação de camundongos Balb/c com LM22QR

Para realizar uma avaliação preliminar do potencial de proteção contra listeriose da proteína quimérica LM22QR foram utilizados 20 camundongos, fêmeas Balb/c, com sete semanas de idade distribuídas em dois grupos vacinais, sendo: Proteína LM22QR (PQR) (n=10); Proteína LM22QR-adjuvante de Freund's (PQR + FA) (n=10) realizados em dois experimentos independentes. Os camundongos receberam duas doses vacinais, no intervalo de duas semanas por via subcutânea (s.c), aplicadas em dois locais diferentes, próximo à base da

cauda e na região dorsal do pescoço, totalizando um volume final de 150 μ L. Cada camundongo vacinado recebeu 30 μ g de proteína LM22QR por dose. As vacinas contendo adjuvante de Freund's (Sigma-Aldrich) foram preparadas nas proporções de 1:1 (proteína:adjuvante), conforme recomendado pela empresa. Quatorze dias após a última dose vacinal, os animais foram desafiados por via intraperitoneal com 1×10^5 UFC/animal de *L. monocytogenes* e foram submetidos a eutanásia com dose letal de cloridrato de xilazina 2% (30 mg/kg) e cloridrato de cetamina 1% (300 mg/kg) por via intraperitoneal (i.p.), quatro dias após o desafio. Baço e fígado foram pesados e fragmentos de baço e fígado foram coletados para contagem de UFC.

Todos os procedimentos experimentais com animais foram aprovados pelo Comitê de Ética Institucional em Experimentação Animal da Universidade Federal de Minas Gerais (protocolo CEUA 144/2017). Camundongos foram distribuídos aleatoriamente e aclimatizados, uma semana antes do início da vacinação, em uma sala a 22°C, 12 horas de luz/12 horas de ciclo escuro, com acesso livre a comida e água.

Análise Estatística

Para a análise da contagem de UFC foi realizada transformação logarítmica e submetidas ao teste ANOVA. As médias foram comparadas através de T Student com auxílio do software GraphPad Prisma 5.0 (GraphPad Prisma software, Inc 5.0, EUA).

RESULTADOS

Predição de epítomos para construção da proteína LM22QR

Após predição *in silico* de epítomos de células T foram observados um total de 27 peptídeos para alelos de MHC I (H-2-Kd, H-2-Dd, H-2-Db, H-2-Ld, H-2-Kk, H-2-Kb) e 22 peptídeos para alelos de MHC II (H-2-IAb, H-2-IAd), totalizando 49 peptídeos preditos para imunização de camundongos (Tabela 5 e 6). Entretanto, após análise de sobreposição, houve redução da quantidade de peptídeos, sendo selecionados 15 preditos para MHC I, 3 preditos apenas para MHC II, mais 3 preditos para ambos os receptores e uma fusão de dois peptídeos (Tabela 7).

Tabela 5 – Total de epítomos preditos *in silico* para MHC I de células T.

Peptídeos	Sequência	Alelo
AFKAVNNSL	CAA42995_2_Ivan	H-2-Kd
AGPNTNGSQ	P84343_1_NcCyP	H-2-Dd
AYISSVAYG	CAA42995_2_Ivan	H-2-Kd
EYIETSKA	CAA42995_2_Ivan	H-2-Kd
FSGTVTQPL	CAC20628_1_Inte	H-2-Db
GPNTNGSQF	P84343_1_NcCyP	H-2-Ld
GTLASLTNL	CAC20628_1_Inte	H-2-Ld, H-2-Kd
GVPIAYTTN	CAA42995_2_Ivan	H-2-Dd
KAVNNSLNV	CAA42995_2_Ivan	H-2-Db
KEGYTFKGW	CAC20628_1_Inte	H-2-Kk
KMPANDITL	CAC20628_1_Inte	H-2-Dd, H-2-Db
LAWEWWRVTV	KKO43736_1_List	H-2-Kb
NGFGRIGRL	CWW15582_1_Glic	H-2-Dd
NPPAYISSV	CAA42995_2_Ivan	H-2-Ld
NQISDLTPL	CAC20628_1_Inte	H-2-Kd, H-2-Db
NQLEDISPI	CAC20628_1_Inte	H-2-Db
PTIASASTV	ABI51620_1_Prot	H-2-Kd
SGAGVDNSI	ABI51620_1_Prot	H-2-Dd, H-2-Kd
SINQNNADI	KKO43736_1_List	H-2-Db
SLNVNFGAI	KKO43736_1_List	H-2-Db
SYTNEVSYT	CAC20628_1_Inte	H-2-Kd
TIASASTVV	ABI51620_1_Prot	H-2-Kd
TPLGILTNL	CAC20628_1_Inte	H-2-Ld
VPIAYTTNF	CAA42995_2_Ivan	H-2-Kb, H-2-Ld
WNNLSSSSI	ABI51620_1_Prot	H-2-Kd
YLPGNARNI	KKO43736_1_List	H-2-Dd
YTFKGWYDA	CAC20628_1_Inte	H-2-Ld

Tabela 6 – Total de epítomos preditos *in silico* para MHC II de células T.

Peptídeos	Sequências	Alelo
AAPTIASASTVVVEA	ABI51620.1	H-2-IAb
AFAAPTIASASTVVV	ABI51620.1	H-2-IAb
AGIAVTFAAAPTIA	ABI51620.1	H-2-IAb
ATAGIAVTFAAPTI	ABI51620.1	H-2-IAb
ATIAATAGIAVTAF	ABI51620.1	H-2-IAb
AVTFAAAPTIASAST	ABI51620.1	H-2-IAb
FAAPTIASASTVVVE	ABI51620.1	H-2-IAb
GIAVTFAAAPTIASA	ABI51620.1	H-2-IAb
IAVTFAAAPTIASAS	ABI51620.1	H-2-IAb
KATIAATAGIAVTAF	ABI51620.1	H-2-IAb
KKATIAATAGIAVTA	ABI51620.1	H-2-IAb
TYPGALVKANSELV	KKO43736.1	H-2-IAb
MKKATIAATAGIAVT	ABI51620.1	H-2-IAd, H-2-IAb
PDITWNLPSYTNEVS	CAC20628.1	H-2-IAb
SLTYPGALVKANSEL	CAA42995.2	H-2-IAb
SMANAGPNTNGSQFF	P84343.1	H-2-IAb
TFAAAPTIASASTVV	ABI51620.1	H-2-IAb
TAGIAVTFAAAPTIA	ABI51620.1	H-2-IAb
TFSGTVTQPLKAIFN	CAC20628.1	H-2-IAb
TIAATAGIAVTAF	ABI51620.1	H-2-IAd, H-2-IAb
TYPGALVKANSELVE	CAA42995.2	H-2-IAb
VTFAAAPTIASASTV	ABI51620.1	H-2-IAb

Tabela 7 – Epítomos preditos selecionados para construção da proteína LM22QR

Peptideo	Receptor de afinidade	Proteína	Afinidade
SGAGVDNSI	MHCI	Proteína p60	Fraca
WNNLSSSSI	MHCI	Proteína p60	Forte
GVPIAYTTNF	MHCI	Ivanolisina	Forte
AFKAVNNSLNV	MHCI	Ivanolisina	Forte
NPPAYISSVAYG	MHCI	Ivanolisina	Fraca
EYIETTSKA	MHCI	Ivanolisina	Fraca
YTFKGWYDA	MHCI e II	Internalina A	Fraca
NQISDLTPLGILTNL	MHCI	Internalina A	Forte
GTLASLTNL	MHCI	Internalina A	Fraca
KMPANDITL	MHCI	Internalina A	Forte
NQLEDISPI	MHCI	Internalina A	Forte
NGFGRIGRL	MHCI	GAPDH	Fraca
LAWEWWRVTV	MHCI	Listeriolisina O	Fraca
SINQNNADI	MHCI	Listeriolisina O	Fraca
SLNVNFGAI	MHCI	Listeriolisina O	Forte
YLPGNARNI	MHCI	Listeriolisina O	Fraca
MKKATIAATAGIAVTFAAAPTIASASTVVVEA	MHCI e II	Proteína p60	Forte
SLTYPGALVKANSELVE	MHCII	Ivanolisina	Fraca
PDITWNLPSYTNEVS	MHCII	Internalina A	Fraca
TFSGTVTQPLKAIFN	MHCI e II	Internalina A	Fraca
LTPGALVKANSELV	MHCII	Listeriolisina O	Fraca
SMANAGPNTNGSQFF	MHCI e II	Peptidil-prolil isomerase	Fraca

Peptídeo em negrito refere-se a dois peptídeos preditos próximos fundidos.

Peptídeos em vermelho indicam região de fusão.

Construção proteína quimérica LM22QR

A proteína quimérica LM22QR foi construída utilizando metionina inicial, 22 epítomos de células T preditos selecionados ordenados com epítomos MHC II seguidos de epítomos de MHC I conectados por uma sequência ligante de 3xGli (GGG). De acordo com análise realizada no *sequence manipulation suite* (https://www.bioinformatics.org/sms2/protein_mw.html) a proteína quimérica final gerada tem 1.023 pares de base, 341 aminoácidos e peso molecular de 33,3 kilodaltons (kDa), ponto isoeletrico pH 6,23. A sequência de nucleotídeos e de aminoácidos da proteína quimérica recombinante final expressa no plasmídeo PRQLM estão representadas na Figura 7.

A

MKKATIAATAGIAVTAFAPTIASASTVVVEAGGGSLTYPGALVKANSELVEGGGPD
ITWNLPSYTNEVSGGGTFSGTVTQPLKAIFNGGGLTYPGALVKANSELVGGGSMANA
GPNTNGSQFFGGGSGAGVDNSIGGGWNNLSSSSIGGGVPIAYTTNFGGGAFKAVNN
SLNVGGGNPPAYISSVAYGGGGEYIETTSKAGGGKEGYTFKGWYDAGGGNQISDLTP
LGILTNLGGGGTLASLTNLGGGKMPANDITLGGGNQLEDISPIGGGNGFGRIGRLGGG
LAWEWWRTVGGGSINQNNADIGGGSLNVNFGAIGGGYLPGNARNI

B

ccatggggatgaaaaagcgaccattgcgggcaccgcgggcattgcggtgaccgctttgcgggcggcaccattgcgagcgcgag
caccgtggtggtggaagcggggcggcgagcctgacctatccgggcgcgctggtgaaagcgaacagcgaactggtggaaggcgg
cgccccgatattacctggaacctgccgagctataccaacgaagtgagcggcgggcggcaccttagcggcaccgtgaccagccgc
tgaaagcgatttttaacggcgggcggcctgacctatccgggcgcgctggtgaaagcgaacagcgaactggtggggcggcgagcagc
gcgaacgcggggcccgaacaccaacggcagccagtttttggcgggcggcagcggcgggcggtggataacagcattggcgggcggc
tggaacaacctgagcagcagcagcattggcgggcgggcggtgccgattgctataccaccaactttggcgggcgggcggttaagc
ggtgaacaacagcctgaacgtggcgggcggaaccgcccggcgatattagcagcgtggcggtatggcgggcgggcggaatatattg
aaaccaccagcaaagcggggcggcggaagaaggctatactttaaggctggtatgatgcgggcgggcggaaccagattagcgat
ctgaccccgtgggcattctgaccaacctggcgggcgggcgggcacctggcgagcctgaccaacctggcgggcgggcaaaatgccgg
cgaacgatattacctggcgggcggaaccagctggaagatattagcccattggcgggcggaaccgctttggccgcatggcgcc
tggcgggcgggcctggcggtgggaatggtggcgccaccgtggcgggcgggcagcattaaccagaacaacgcggatattggcgggcgga
gcctgaacgtgaactttggcgcgattggcgggcggtatctgccgggcaacgcgcgaacattctcgagcatcatcatcatcatcatt
ag

C

MGMKKATIAATAGIAVTAFAPTIASASTVVVEAGGGSLTYPGALVKANSELVEGG
GPDITWNLPSYTNEVSGGGTFSGTVTQPLKAIFNGGGLTYPGALVKANSELVGGGSM
ANAGPNTNGSQFFGGGSGAGVDNSIGGGWNNLSSSSIGGGVPIAYTTNFGGGAFKA
VNNSLNVGGGNPPAYISSVAYGGGGEYIETTSKAGGGKEGYTFKGWYDAGGGNQIS
DLTPLGILTNLGGGGTLASLTNLGGGKMPANDITLGGGNQLEDISPIGGGNGFGRIGR
LGGGLAWEWWRTVGGGSINQNNADIGGGSLNVNFGAIGGGYLPGNARNILEHHHH
HH

Figura 7 – Construção da proteína quimérica recombinante LM22QR (A) Sequência da proteína quimérica proposta iniciada com metionina e com 22 epítomos preditos selecionados separados por sequência linker de 3xGli. (B) Sequência de nucleotídeos clonados em pET28a (+) nos sítios NcoI e XhoI gerando o plasmídeo PRQLM. (C) Proteína quimérica recombinante final no plasmídeo de PRQLM. Metionina (negrito), epítomos (preto), sequência 3xGli (vermelho) e 6xHis (azul), sítio de enzima de restrição (sublinhado), códon finalizador (laranja), nucleotídeo adicionados para ajuste de frame (verde).

Expressão de proteína quimérica LM22QR

E. coli BL21 contendo o plasmídeo PRQLM após indução com IPTG expressou fortemente uma proteína com peso molecular de aproximadamente 33 kDa, reconhecida como a proteína quimérica LM22QR. A análise do sedimento e sobrenadante do lisado bacteriano por SDS-PAGE demonstrou que a expressão da LM22QR ocorreu na fração insolúvel (sedimento) do lisado bacteriano (Figura 8A). Após a purificação por cromatografia de afinidade da proteína fortemente expressa, ela apresentava o peso molecular esperado de 33 kDa (Figura 8B). Análise por *Western blot* confirmou a presença da proteína quimérica LM22QR em lisado bruto ou purificado de BL21 plasmídeo PRQLM (Figura 8C). Mesmo sem indução com IPTG foi possível observar expressão, em menor intensidade, da LM22QR tanto no gel de SDS quanto o *Western blot*.

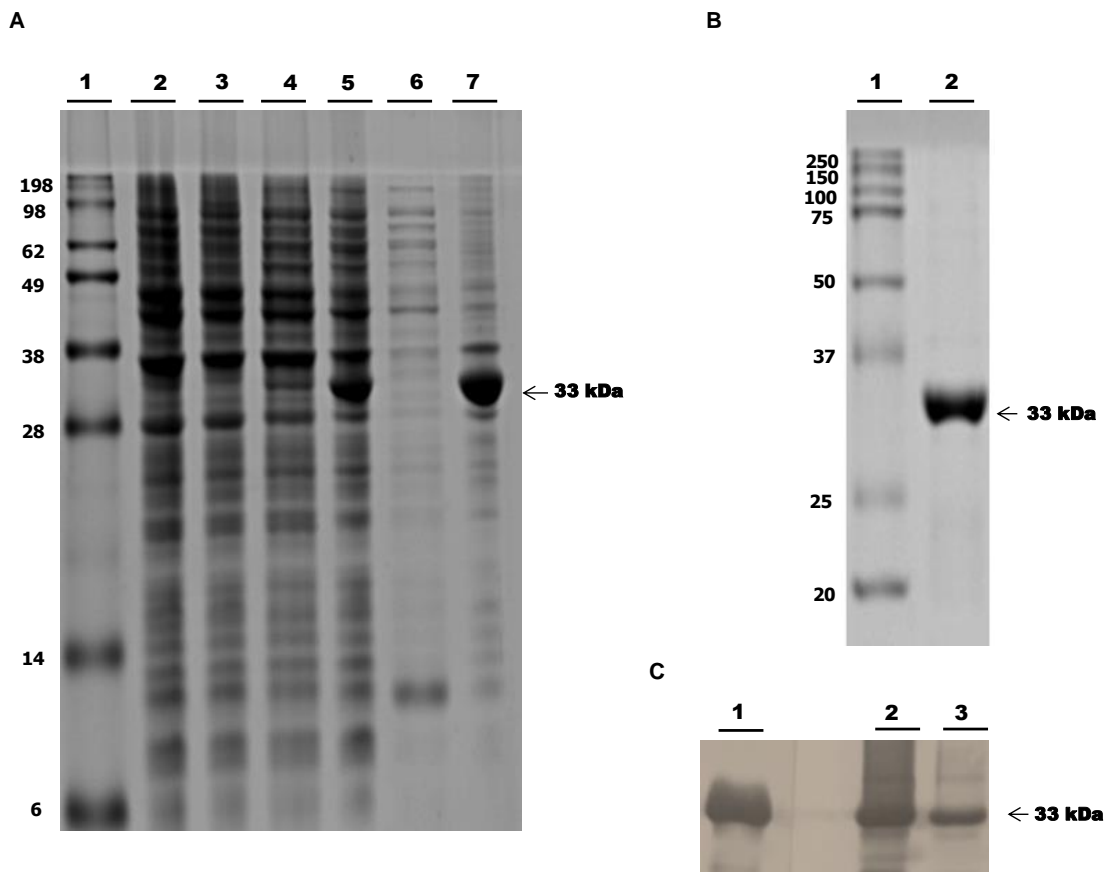


Figura 8 – Análise da expressão, solubilidade e purificação da proteína recombinante quimérica LM22QR em SDS/PAGE. O plasmídeo PRQLM foi clonado em *E. coli* BL21, e a bactéria transformada foi induzida com IPTG. (A) Gel SDS com expressão forte da proteína LM22QR com 33

kDa em *E. coli* BL21 transformada e induzida com IPTG, presente na fração insolúvel do extrato bruto. Identificação das canaletas: (1) peso molecular); (2) *E. coli* BL21 vazia não induzida; (3) *E. coli* BL21 vazia induzida; (4) *E. coli* BL21 com transformada não induzida; (5) *E. coli* BL21 transformada induzida; (6) Fração solúvel do lisado bruto de *E. coli* BL21 transformada induzida; (7) Fração insolúvel lisado bruto de *E. coli* BL21 transformada induzida. (B) Gel SDS da proteína LM22QR com 33 kDa após purificação por coluna de cromatografia de afinidade (1) Peso Molecular e (2) proteína LM22QR; (C) *Western blot* com marcação anti-6xHIS da proteína LM22QR. Ordem das canaletas representa: (1) proteína LM22QR purificada; (2) *E. coli* BL21 transformada induzida; (3) *E. coli* BL21 transformada não induzida.

Estudo preliminar de camundongos vacinados com proteína LM22QR

A fim de avaliar o possível efeito imunogênico da proteína LM22QR, realizamos um ensaio preliminar *in vivo* avaliando dois protocolos vacinais, sendo: Grupo vacinado somente com a proteína LM22QR e outro grupo vacinado com a proteína LM22QR associada ao adjuvante de Freund's. Observamos que houve redução da contagem bacteriana recuperada no baço e fígado de animais vacinados com proteína quimérica LM22QR associada ao adjuvante de Freund's (Figura 9). Além disso, observamos que dois animais não resistiram à infecção quando vacinados apenas com a proteína LM22QR e desafiados com *L. monocytogenes*.

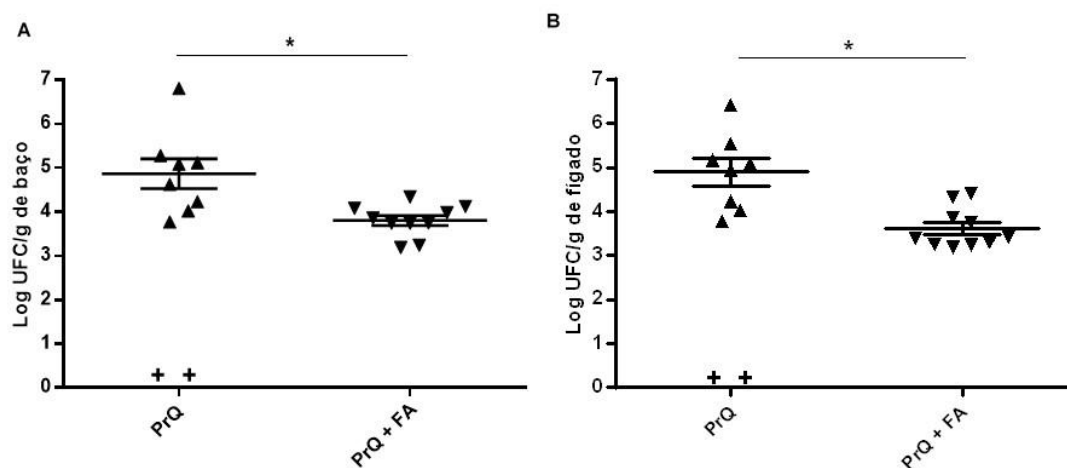


Figura 9 – Carga bacteriana encontrada no baço e fígado de camundongos vacinados com proteína quimérica LM22QR. Camundongos foram vacinados com proteína LM22QR (PrQ) e com a proteína LM22QR associada ao adjuvante de Freund's (PrQ + FA); (A) Recuperação bacteriana de baço (B) Recuperação bacteriana de fígado; (+) óbito de camundongos antes do dia da eutanásia (Test T de student * $p < 0,005$).

DISCUSSÃO

O desenvolvimento vacinal contra listeriose é pertinente considerando a importância da doença como zoonose e também por não haver vacina comercial disponível contra listeriose humana ou animal. A predição *in silico* é uma ferramenta que integra informações computacionais e sequências de genomas de interesse, identificando fatores de patogenicidade e proteínas de interesse para o reconhecimento e desenvolvimento de uma resposta pelo sistema imune, confirmado posteriormente por experimentos biológicos (de Macedo Junior et al., 2019). A construção de uma proteína quimérica com epítomos imunogênicos de *L. monocytogenes* otimizaria o reconhecimento dos antígenos para a construção de uma resposta imunológica potencializada pela presença do adjuvante. Semelhante ao apresentado nos estudos envolvendo proteína quimérica contra outros patógenos como leptospirose (Santos et al., 2018) e *E. coli* (Nazarian et al., 2012).

Nesse estudo, a proteína quimérica LM22QR associada ao adjuvante de Freund's, demonstrou reduzir a infecção bacteriana em baço e fígado de camundongos contra listeriose. Vacinas recombinantes constituídas por proteínas ou peptídeos imunogênicos são seguras e rapidamente reconhecidas pelo sistema imune do hospedeiro. Com auxílio de adjuvantes, essas vacinas recombinantes estimulam fortemente a resposta imune celular do hospedeiro com capacidade de protegê-lo contra o patógeno. Embora tenham estudos explorando vacinas de subunidades ou proteínas recombinantes contra listeriose (Ito et al., 2004; Rio et al., 2015; Calderon-Gonzalez et al., 2015), este é primeiro trabalho que propõe avaliar o potencial vacinal de uma proteína quimérica recombinante construída a partir de peptídeos preditos.

A utilização da vacinologia reversa, desenvolvida através de sequenciamento genômico e proteômico de microorganismos, utilizando a bioinformática, tem sido um grande aliado nas pesquisas de vacinas seguras, mais específicas com mínimo de efeitos adversos (Soria-Guerra et al., 2015).

Estudos vacinais contra listeriose demonstram que a vacina constituída apenas por adjuvante de Freund's sozinho (Okamoto et al., 2001; Rolph e Kaufmann, 2000) ou associado à HKLM (Okamoto et al., 2001) são incapazes de induzir proteção em animais imunizados desafiados, provocando a mortalidade dos camundongos vacinados e desafiados (Koga et al., 1987) como demonstrado no capítulo II deste trabalho.

Por não ter um grupo de camundongos não vacinados ou vacinados somente com adjuvante de Freund's, a capacidade imunogênica da proteína quimérica LM22QR deverá ser melhor investigada. Mas parece promissor o potencial vacinal da proteína quimérica

LM22QR na proteção contra listeriose sistêmica, em modelo murino. Reforçando o conceito de que análise *in silico* pode promover o desenvolvimento de melhores candidatos à vacina.

CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos, é possível concluir que a predição *in silico* de epítomos de células T é uma ferramenta importante a ser explorada para o reconhecimento específico de imunógenos pelo sistema imune do hospedeiro. A predição *in silico* permitiu a construção da proteína quimérica LM22QR a fim de facilitar o reconhecimento de *L. monocytogenes* pelas células de camundongos vacinados com a possibilidade de construção de vacinas seguras contra listeriose.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

1. Abram, M. Schlüter D, Vuckovic D, Waber B, Doric M, Deckert M. Effects of pregnancy-associated *Listeria monocytogenes* infection: necrotizing hepatitis due to impaired maternal immune response and significantly increased abortion rate. *Virchows Arch.*, 2002; 441: 368–379.
2. Chand, P.; Sadana J.R. Outbreak of *Listeria ivanovii* abortion in sheep in India. *Veterinary Record.*,1999; 145: 83-84.
3. Calderon-Gonzalez R, Frande-Cabanes E, Bronchalo-Vicente L, Lecea-Cuello MJ, Pareja E, Bosch-Martínez A, et al. Cellular vaccines in listeriosis: role of the *Listeria* antigen GAPDH. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 2014; 4-22.
4. Calderon-Gonzalez R., Tobes R., Pareja E., Frande-Cabanes E., Alaez-Alvarez L., Petrovsky N.; et al. Identification and characterisation of T-cell epitopes for incorporation into dendritic cell-delivered *Listeria* vaccines. *J Immunol Methods.*, 2015; 9: 111–119.
5. Calderon-Gonzalez R., Terán-Navarro H., Frande-Cabanes E., Ferrández-Fernández E., Freire J., Penadés S., et al. Pregnancy vaccination with gold glyco-nanoparticles carrying *Listeria monocytogenes* peptides protects against listeriosis and brain-and cutaneous-associated morbidities. *Nanomaterials.*, 2016; 6(8), 151.
6. Calderon-Gonzalez, R.; Frande-Cabanes, E.; Teran-Navarro, H.; et al. GNP-GAPDH₁₋₂₂ nanovaccines prevent neonatal listeriosis by blocking microglial apoptosis and bacterial dissemination. *Oncotarget.*, 2017; 8(33): 53916-53934.
7. Cruz, C.D; Martinez, M.B.; Destro, M.T. *Listeria monocytogenes*: um agente infeccioso ainda pouco conhecido no brasil. *Alim. Nutr.*, Araraquara., 2008;19;2: 195-206.
8. de Macedo Junior L.M., Melo T.F., Peconick, A.P. Predição *in silico* de epítomos antigênicos para produção de uma vacina humana contra leishmaniose visceral. *Scire Salutis.*, 2019; 9(1): 62-71.
9. Drevets D.A., Bronze, M.S. *Listeria monocytogenes*: epidemiology, human disease, and mechanisms of brain invasion. *FEMS Immunol Med Microbiol.*, 2008; 53 (20):151–165.
10. D’Orazio, S.E.; Troese, M.J.; Starnbach, M.N. Cytosolic localization of *Listeria monocytogenes* triggers an early IFN-gamma response by CD8 T cells that correlates with innate resistance to infection. *J Immunol.*, 2006.; 177: 7146–7154.

11. Hofer, E., Ribeiro, R., Feitosa, D.P. Species and serovars of the genus *Listeria* isolated from different sources in Brazil from 1971 to 1997. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.*, 2000; 95: 615-20.
12. Griffiths, K.L.; Khader, S.A. Novel vaccine approaches for protection against intracellular pathogens. *Current opinion in immunology.*, 2014; 28: 58–63.
13. Guillet, C., Join-Lambert, O., Le Monnier, A., Leclercq, A., Mechaï, F., Mamzer-Bruneel, M.F., Bielecka, M.K., Scotti, M., Disson, O., Berche, P., Vazquez-Boland, J., Lortholary, O., Lecuit, M. Human listeriosis caused by *Listeria ivanovii*. *Emerg. Infect. Dis.*, 2010; 16: 136-138.
14. Hoelzer K., Pouillot R., Dennis S. Animal models of listeriosis: a comparative review of the current state of the art and lessons learned. *Vet Res.*, 2012; 43(1): 18.
15. Ito SI, Ishii KJ, Shirota H, Klinman D M. CpG oligodeoxynucleotides improve the survival of pregnant and fetal mice following *Listeria monocytogenes* infection. *Infection and immunity.*, 2004; 72(6): 3543-3548.
16. Ivanek, R.; Grohn, Y.T.; Tauer, L.W.; Wiedmann, M. The cost and benefit of *Listeria monocytogenes* food safety measures. *Crit Rev Food Sci Nutr.*, 2004; 44:513–523.
17. Koga T, Mitsuyama M, Handa T, Yayama T, Muramori K, Nomoto K. Induction by killed *Listeria monocytogenes* of effector T cells mediating delayed-type hypersensitivity but not protection in mice. *Immunology.*, 1987; 62(2):241-8.
18. Kono, M.; Nakamura, Y.; Suda, T.; Uchijima, M.; Tsujimura, K.; Nagata, T.; et al. Enhancement of protective immunity against intracellular bacteria using type-1 polarized dendritic cell (DC) vaccine. *Vaccine.*, 2012; 30(16): 2633-2639.
19. Nazarian S., Gargari S.L.M., Rasooli I., Amani J., Bagheri, S., Alerasool, M. An *in silico* chimeric multi subunit vaccine targeting virulence factors of enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) with its bacterial inbuilt adjuvant. *J Microbiol Met.*, 2012., 90(1): 36-45.
20. Nielsen, M; Lund O. NN-align. An artificial neural network-based alignment algorithm for MHC class II peptide binding prediction. *BMC Bioinform.*, 2009; 10:296.
21. Núñez-Montero, K.; Leclercq, A.; Moura, A.; Vales, G.; Peraza, J.; Pizarro-Cerdá, J.; Lecuit, M. *Listeria costaricensis* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol.*, 2018; 68(3):844-850.
22. Orsi, R.H; Wiedmann, M. Characteristics and distribution of *Listeria* spp., including *Listeria* species newly described since 2009. *Applied Microbiology and Biotechnology.* 2016; 100:5273-5287.

23. Okamoto S, Kawabata S, Nakagawa I, Hamada S. Administration of Superantigens Protects Mice from Lethal *Listeria monocytogenes* Infection by Enhancing Cytotoxic T Cells. *Infection and Immunity.*, 2001; 6633–6642.
24. Rio R-D., E.; Marradi M., Calderon-Gonzalez R., Frande-Cabanes E., Penadés S., Petrovsky, N., et al. A gold glyco-nanoparticle carrying a listeriolysin O peptide and formulated with Advax™ delta inulin adjuvant induces robust T-cell protection against listeria infection. *Vaccine.*, 2015; 33: 1465–1473.
25. Rolph MS, Kaufmann SHE. Partially TAP-Independent Protection Against *Listeria monocytogenes* by H2-M3-Restricted CD8⁺ T Cells. *J Immunol October.*, 2000; 15; 165 (8) 4575-4580.
26. Santos J.C., Nascimento A.L.T.O. Vaccine Design: Chimeras could help in the fight against leptospirosis. *eLife.*, 2018; 7: e34087.
27. Snapir Y.M., Vaisbein E., Nassar F. Low virulence but potentially fatal outcome *Listeria ivanovii*. *Europ J Inter Medic*, 2006; 17: 286–287.
28. Soria-Guerra R.E., Nieto-Gomez R., Govea-Alonso D.O., Rosales-Mendoza, S. An overview of bioinformatics tools for epitope prediction: implications on vaccine development. *J Biomed Informat.*, 2015; 53: 405-414.
29. Vázquez-Boland, J.-A., Kuhn, M., Berche, P., Chakraborty, T., Domínguez-Bernal, G., Goebel, González-Zorn, W., B., Wehland, J. , Kreft, J. *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. *Clin Microbiol.*, 2001; 14, 584–640.