

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Escola de Veterinária

Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal

Gabriel Henrique Guimarães

**PAPEL DOS RECEPTORES β 2-ADRENÉRGICOS NA RESPOSTA
INFLAMATÓRIA A *Listeria monocytogenes* EM MODELO MURINO**

Belo Horizonte

2024

Gabriel Henrique Guimarães

**PAPEL DOS RECEPTORES β 2-ADRENÉRGICOS NA RESPOSTA
INFLAMATÓRIA A *Listeria monocytogenes* EM MODELO MURINO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Orientadora: Profa. Dra. Tatiane Alves da Paixão

Co-orientador: Prof. Dr. Renato de Lima Santos

Belo Horizonte

2024

G118p Guimarães, Gabriel Henrique, 1997-
Papel dos receptores B2 – Adrenérgicos na resposta inflamatória A
Listeria Monocytogenes em modelo Murino/ Gabriel Henrique Guimarães. –
2024.
52 f: il.

Orientadora: Tatiane Alves da Paixão
Coorientador: Renato de Lima Santos

Dissertação (Mestrado) apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária da
UFMG, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência
Animal.

Inclui Bibliografia.

1. Camundongos como animal de laboratório - Teses – 2. Doenças
transmissíveis em animais - Teses - I. Paixão, Tatiane Alves da - II. Santos,
Renato de Lima – III. Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de
Veterinária – IV. Título.

CDD – 636.089 69

Bibliotecária responsável Cristiane Patrícia Gomes CRB 2569
Biblioteca da Escola de Veterinária, UFMG.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ESCOLA DE VETERINÁRIA
COLEGIADO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL
FOLHA DE APROVAÇÃO
GABRIEL HENRIQUE GUIMARÃES

Dissertação submetida à banca examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA ANIMAL, como requisito para obtenção do grau de MESTRE em CIÊNCIA ANIMAL, área de concentração PATOLOGIA ANIMAL.

Aprovado(a) em 15 de março de 2024, pela banca constituída pelos membros:

Dr.(a). Tatiane Alves da Paixão - Orientador(a)

Dr.(a). Teane Milagres Augusto da Silva

Dr.(a). Juliana Terzi Maricato



Documento assinado eletronicamente por **Tatiane Alves da Paixão, Professora do Magistério Superior**, em 25/03/2024, às 10:12, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Teane Milagres Augusto Gomes, Usuário Externo**, em 25/03/2024, às 15:44, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Juliana Terzi Maricato, Usuária Externa**, em 25/03/2024, às 17:03, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **3095096** e o código CRC **9A773886**.

AGRADECIMENTOS

Eu gostaria de agradecer primeiramente aos meus pais, Lucimara e Roberto, que sempre foram os maiores apoiadores da minha busca por conhecimento. Eles fizeram todo o possível para que nunca faltassem meios de atingir meus sonhos. Eles me disseram: “A única coisa que nunca podem tirar de você é o estudo”. Eu amo vocês.

Gostaria de agradecer ao meu irmão, Alan, que muito além de um irmão, sempre foi meu segundo pai. Ele sempre esteve ao meu lado e me dando conselhos

De forma não-convencional, eu gostaria de agradecer a uma série de cachorros. Mel, Tina, Meg, Neguinha, Shakira e Athena são os muitos motivos que me levaram a me apaixonar por animais e escolher a medicina veterinária. Se realmente existir um Paraíso, eu gostaria que houvesse um lugar especial para vocês. Yumi, Mitose, Guito e Ravi (único gato da lista) eu gostaria de agradecer por terem me alegrado nestes últimos anos e eliminado as energias negativas que me puxavam para baixo.

Agradeço aos muitos professores que fomentaram a minha sede por conhecimento e ajudaram na construção do meu caráter. Agradeço especialmente à minha orientadora professora Tatiane Alves da Paixão e ao meu co-orientador professor Renato de Lima Santos, que deram o suporte e o apoio necessários nesta etapa da minha formação profissional.

Agradeço aos meus amigos por toda a companhia. Àqueles de longa data, e também aos mais recentes. Obrigado por terem sido a orelha que escuta, o riso que alegra, o tapa que devolve à realidade, o ombro que suporta litros de lágrimas. Não há um Gabriel sem vocês, porque vocês são parte de mim.

Obrigado aos meus colegas de faculdade, de residência e de mestrado pela companhia nesse trajeto de busca pelo conhecimento. Gostaria de agradecer especialmente à Monique, que com sua grande personalidade materna me deu uns bons puxões de orelha. Que seu filho, Daniel, nasça repleto de saúde e cresça em graça e felicidade, pois você será a melhor mãe que ele poderia ter.

Agradeço aos funcionários que atuam no setor de patologia por todo o suporte técnico (e psicológico) que vocês me forneceram nessa etapa. Um obrigado especial a Acácia, Camila,

Lorena, Leimar, Nayara, Valéria e Vitalina. Sem vocês nos bastidores, não haveria espetáculo algum.

Agradeço à UFMG pela oportunidade de pós-graduação, pelo corpo docente e pela estrutura. Seu enorme legado faz jus à sua grandeza.

Agradeço por fim à CAPES pelo fornecimento de bolsa, sob processo 88887.685360/2022-00, que foi fundamental para minha manutenção em Belo Horizonte, longe da minha família, e para dedicação integral aos estudos.

"Diga o quanto você ama a quem você ama. Mas não fica só na declaração, gente. Ame na prática, na ação. Amar é ação. Amar é arte"

Paulo Gustavo.

RESUMO

O sistema nervoso simpático, mediado pelas catecolaminas através dos receptores adrenérgicos (ARs), desempenha um papel na resposta imune, predominantemente imunossupressor. Este estudo foca nos receptores beta-adrenérgicos (β ARs), especificamente o subtipo β 2AR, e seu papel nas respostas imunológicas em um modelo murino de infecção por *Listeria monocytogenes*, importante patógeno zoonótico de origem alimentar, que causa quadro clínicos de abortos, meningoencefalite e infecções septicêmicas. Camundongos C57/BL6 WT, e β 2AR^{-/-} ou C57/BL6 WT tratados com antagonistas dos β ARs (nadolol e ICI 118,551) foram avaliados na infecção aguda por *L. monocytogenes*. Foram realizadas análises de recuperação bacteriana, avaliação histopatológica, imuno-histoquímica e mensuração de citocinas. A ausência de β 2AR e o bloqueio farmacológico reduziram significativamente a recuperação bacteriana. Níveis séricos de IFN- γ aumentaram, mas não houve uma alteração significativa no perfil de IL-10 em ambos modelos. Camundongos β 2AR^{-/-} apresentaram menor escore de lesões histopatológicas, enquanto os antagonistas β ARs não reduziram o grau de lesão tecidual. A redução da recuperação bacteriana, aumento de IFN- γ e a menor gravidade das lesões histopatológicas em camundongos β 2AR^{-/-} indicam uma resposta mais eficaz contra o patógeno. No entanto, o bloqueio farmacológico reproduziu parcialmente esse efeito, possivelmente devido à farmacocinética das drogas.

Palavras-chave: camundongos, infecção, listeriose, receptores adrenérgicos.

ABSTRACT

The sympathetic nervous system, mediated by catecholamines through adrenergic receptors (ARs), plays a role in the immune response, predominantly immunosuppressive. This study focuses on beta-adrenergic receptors (β ARs), specifically the β 2AR subtype, and its role in immune responses in a murine model of *Listeria monocytogenes* infection, an important foodborne zoonotic pathogen that causes clinical conditions such as abortions, meningoencephalitis, and septicemic infections. C57/BL6 WT, β 2AR^{-/-} mice and mice treated with β AR antagonists (nadolol and ICI 118,551) evaluated in acute infection by *L. monocytogenes*. Analyses of bacterial recovery, histopathological evaluation, immunohistochemistry, and cytokine measurement were performed. The absence of β 2AR and pharmacological blockade significantly reduced bacterial recovery. Serum levels of IFN- γ increased, but there was no significant change in the IL-10 profile. β 2AR^{-/-} mice showed a lower histopathological lesion score, while β AR antagonists did not reduce the degree of tissue damage. The reduction in bacterial recovery, increased IFN- γ , and less severe histopathological lesions in β 2AR^{-/-} mice indicate a more effective response against the pathogen. However, pharmacological blockade reproduced partially this effect, possibly due to drug pharmacokinetics.

Key words: adrenergic receptores, infection, listeriosis, mice.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Fluxograma do delineamento do experimento 1 _____ 33

Figura 2: Fluxograma do delineamento do experimento 2 _____ 35

Figura 3. **Recuperação bacteriana no baço e fígado de camundongos C57/BL6 infectados por *Listeria monocytogenes*.** No primeiro experimento, foram utilizados animais WT e $\beta 2AR^{-/-}$ (n=9) (A e B). No segundo experimento, foram utilizados animais WT com administração intraperitoneal de PBS, nadolol ou ICI 118,551 duas vezes ao dia (n=6) (C e D). Em ambos experimentos, baço e fígado foram coletados no terceiro dia após infecção intraperitoneal com 1×10^5 CFU de *L. monocytogenes*/camundongo. Cada ponto representa um animal e as barras indicam médias e desvio padrão. A linha pontilhada representa o limite de detecção do teste ($1,3 \log_{10}$). Os dados foram transformados em logarítmicos, submetidos aos testes t-Student (A e B) ou one-way ANOVA e as médias comparadas pelo teste de Tukey (C e D), sendo utilizado o grupo Infectado como controle (*p < 0,05; **p<0,01) _____ 37

Figura 4. **Avaliação de esplenomegalia e variação do peso relativo em camundongos infectados por *L. monocytogenes*.** (A) Mensuração relativa do peso do baço pelo peso dos animais. Cada ponto representa um animal, e os traços representam a mediana com intervalo interquartil. Os dados foram submetidos ao teste de Kruskal-Wallis e as medianas comparadas pelo teste de Dunn (n=6). (B) Variação do peso relativo dos animais ao longo dos 3 dias de infecção. O peso de cada animal no dpi 0 foi considerado como 100%. Cada ponto representa a média do grupo e os traços representam o erro padrão. Os dados foram submetidos ao teste 2-way ANOVA e a variação das médias comparadas pelo teste de Tukey (n=6) (*p < 0,05; **p<0,01) _____ 38

Figura 5. **Perfil sorológico de IFN- γ e IL-10 em camundongos C57/BL6 infectados por *L. monocytogenes*, em dois experimentos.** No primeiro experimento, foram utilizados animais WT e $\beta 2AR^{-/-}$ (n=9) (A e B). No segundo experimento, foram utilizados animais WT com administração intraperitoneal de PBS, nadolol ou ICI 118,551 duas vezes ao dia (n=6) (C e D). No 3º dia pós-infecção, os animais foram eutanasiados através de sangria por punção cardíaca para coleta de soro. O soro foi submetido à técnica de ELISA em placas de 96 micropoços para mensuração do nível sérico destas citocinas. A leitura foi realizada no comprimento de onda de 490 nm e as concentrações de citocinas (pg/mL) foram determinadas por comparação com uma curva padrão. As barras representam a média com desvio padrão. Os dados foram submetidos aos testes t-Student (A e B) ou one-way ANOVA e as médias comparadas pelo teste de Tukey (C e D) (*p < 0,05; **p<0,01, ****p<0,0001) _____ 39

Figura 6. **Fotomicroscopias representativas das lesões observadas em baço e fígado de camundongos infectados por *Listeria monocytogenes*.** (A) Fígado de animais não-infectados e com uso de antagonistas β -adrenérgicos (nadolol ou ICI 118,551) exibiram degeneração hepatocelular discreta a moderada. HE, 200X. (B) e (C) Fígado de animais infectados por *L. monocytogenes*, apresentando infiltrado inflamatório neutrofílico e histiocitária em arranjo nodular (microabscessos), com vezes com extensa área de necrose liquefativa central. HE, 200X. (D). Baço de animais infectados por *L. monocytogenes*, apresentando microabscessos (setas). HE, 200X. (E) e (F) Imuno-histoquímica com anticorpo anti-*Listeria* em fígado e baço,

respectivamente, de camundongos infectados por *L. monocytogenes*, demonstrando a presença do agente intralesional, corados em cromógeno Magenta, 400X _____ 41

Figura 7. Escore de lesões histopatológicas em baço e fígado de camundongos infectados por *L. monocytogenes*. (A) Fotomicroscopia representativa do fígado de camundongo infectado, demonstrando microabcesso (à esquerda) e extensiva área de necrose (à direita) (HE, 200x). (B) Marcação imuno-histoquímica de *L. monocytogenes* (bastonetes em magenta) em fígado de animal infectado, demonstrando o agente intralesional (cromógeno Magenta, 400x). (C e D) Escore histopatológico de baço e fígado do experimento 1, com animais $\beta 2AR^{-/-}$ e WT (n=6). (E-H) Escore histopatológico de baço e fígado do experimento 2, com animais WT com aplicação de PBS, nadolol ou ICI 118,551 (n=6). Cada ponto representa um animal e as caixas representam a mediana e os valores mínimos e máximos em quartis. Os dados foram submetidos aos testes de Mann-Whitney (C e D) ou Kruskal-Wallis e as medianas comparadas pelo teste de Dunn (E-H) (*p < 0,05) _____ 42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Receptores adrenérgicos e suas funções fisiológicas no organismo_____ 13

Tabela 2: Função dos receptores adrenérgicos em células do sistema imunológico_____20

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	11
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	13
2.1. SISTEMA NERVOSO SIMPÁTICO.....	13
Expressão adrenérgica na resposta imune inata.....	14
Expressão adrenérgica na resposta imune adaptativa.....	17
Sinalização adrenérgica e sepse.....	20
Estresse, catecolaminas e imunossupressão.....	21
2.2. <i>Listeria monocytogenes</i>.....	23
Biologia.....	23
Epidemiologia.....	24
Patogênese.....	25
Manifestação clínica.....	27
Listeriose em modelo murino.....	29
3. PAPEL DOS RECEPTORES β2-ADRENÉRGICOS NA RESPOSTA INFLAMATÓRIA A <i>Listeria monocytogenes</i> EM MODELO MURINO.....	31
3.1. OBJETIVOS.....	31
3.2. MATERIAL E MÉTODOS.....	32
3.3. RESULTADOS.....	37
3.4. DISCUSSÃO.....	42
4. REFERÊNCIAS.....	44

1.INTRODUÇÃO

O sistema nervoso simpático desempenha papel importante em mecanismos necessários para a sobrevivência, conferindo aumento da capacidade catabólica em resposta a estímulos como atividade física, potenciais agressões e estresse (Strain, 2004). Esse mecanismo é mediado pelas catecolaminas, epinefrina (EP) e norepinefrina (NE), sintetizadas nas fibras nervosas pós-ganglionais e na região medular das adrenais, exercendo função nos receptores adrenérgicos (ARs), classificados como alfa (α AR) ou beta (β AR) e seus subtipos (Strain, 2004).

Praticamente todas as células imunes expressam ARs, e são, portanto, responsivas às catecolaminas. As respostas dos ARs nessas células possuem caráter predominantemente imunossupressor, variando de acordo ao tipo celular e aos receptores estimulados (Sanders *et al.*, 2012, Sharma e Farrar, 2020). Foi demonstrado, em modelo murino, o predomínio de β 2ARs em todas as linhagens celulares imunes, exceto linfócitos T auxiliares subtipo 2 (Th2), exercendo efeitos supressivos, como aumento da produção de IL-10 e inibição da migração de células apresentadoras de antígenos e linfócitos NK (Jetschmann *et al.* 1997; Kohm e Sanders, 2001; Meltzer *et al.*, 2004; Nance e Sanders, 2007; Sanders *et al.*, 2012; Kim *et al.*, 2014; Scanzano *et al.*, 2015; Araujo *et al.*, 2019; Chhatar e Lal, 2021; Devi *et al.*, 2021). Também se observou que a ativação de β 2ARs reduz as respostas de neutrófilos, diminuindo a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) (Scanzano *et al.*, 2015) e a formação de armadilha extracelular de neutrófilos (NETosis) (Marino *et al.*, 2018), ambos mecanismos que exercem papel importante na estase e eliminação de bactérias. Foi demonstrando ainda que a ativação de β 2AR pode diminuir a polarização do macrófago M1 pró-inflamatório e induzir a diferenciação de macrófagos M2 anti-inflamatórios (Grailer *et al.*, 2014; Bacou *et al.*, 2017).

Estudos sugerem que o efeito imunossupressor da ativação β AR pode contribuir para infecções bacterianas, a exemplo da listeriose. Trata-se de uma doença infecciosa causada por *Listeria monocytogenes*, bactéria gram-positiva e intracelular facultativa, e importante patógeno de origem alimentar em seres humanos e animais. É responsável por infecções do sistema nervoso central e trato reprodutivo, com desenvolvimento de casos de meningoencefalite, aborto e infecção neonatal septicêmica (Poston e Kurlander, 1992; Lecuit *et al.*, 2007; Buchrieser *et al.*, 2011; Bergman *et al.*, 2013; Frande-Cabanes *et al.*, 2013). Sabe-se que a listeriose acomete principalmente pessoas com o sistema imunológico comprometido,

como idosos, mulheres grávidas, crianças e indivíduos imunossuprimidos (Schlech, 2000; Vázquez-Boland *et al.*, 2001; Mclauchlin *et al.*, 2004).

Em modelo experimental murino, foi demonstrado que o estresse a temperaturas baixas inibiu as respostas imunológicas do hospedeiro a *L. monocytogenes* (Cao *et al.*, 2002; Cao *et al.*, 2003). Estudos posteriores demonstraram que esse efeito foi devido a estimulação de β 1ARs, e que a supressão desses receptores melhorou a imunidade mediada por células e as respostas defensivas contra *L. monocytogenes* (Emeny *et al.*, 2007).

A ablação química de fibras nervosas simpáticas com 6-hidroxidopamina em modelo murino de infecção aguda por *L. monocytogenes* resultou em menor carga bacteriana no baço e maior influxo esplênico de neutrófilos, enquanto reduziu a quantidade de esplenócitos e a secreção de citocinas pró-inflamatórias (Rice *et al.*, 2001). De forma controversa, um modelo recente de infecção intravenosa por dose letal de *L. monocytogenes* demonstrou que camundongos *knockout*- β 2ARs foram mais suscetíveis ao patógeno do que camundongos *wild type* (WT), sucumbindo precocemente. Ademais, os animais mutantes apresentaram maior esplenomegalia com influxo de linfócitos T CD11b⁺, T CD3⁺ e B CD19⁺, mesmo não exibindo diferença significativa na recuperação bacteriana (Ağaç *et al.*, 2018).

Embora estudos que demonstrem que o bloqueio ou ausência de β 2ARs influencia no curso da infecção *L. monocytogenes*, ainda não está bem descrito se a ausência de β 2ARs é responsável por alterar a resposta inflamatória frente ao patógeno. Para além, não há descrição quanto a alterações tissulares e bioquímicas relacionadas a doses sub-letais de *L. monocytogenes* e bem como características fisiopatológicas do quadro clínico nesses camundongos deficientes de resposta mediada por β 2ARs. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a resposta inflamatória e imunológica de camundongos deficientes de resposta de β 2ARs ao desafio com doses sub-letais de *L. monocytogenes*, comparando curso clínico, recuperação bacteriana, grau de lesões histológicas, padrão imuno-histoquímico e perfil de citocinas.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Sistema nervoso simpático e o sistema imunológico

O sistema nervoso simpático (SNS) desempenha um papel importante em mecanismos autônomos do organismo, necessários para a sobrevivência, conferindo o estado conhecido como “fuga ou luta”, compreendido resumidamente como o aumento da capacidade cardiorrespiratória e catabólica. São estimulados em resposta a atividade física, potenciais agressões e estresse (Strain, 2004). Esse mecanismo é mediado pelos neurotransmissores catecolamínicos epinefrina (EP) e norepinefrina (NE), sintetizados nas fibras nervosas pós-ganglionais e na medular adrenal, que exercem função nos receptores adrenérgicos (ARs), presentes em inúmeros tipos celulares. Os ARs são classificados como alfa ($\alpha 1$ e $\alpha 2$) ou beta ($\beta 1$, $\beta 2$ e $\beta 3$), possuindo funções distintas, que variam conforme o tipo tecidual no qual estes receptores estão presentes. Estas funções estão descritas na tabela 1, segundo Strain (2004).

Tabela 1: Receptores adrenérgicos e suas funções fisiológicas no organismo.

Receptor	Funções
α	• Vasoconstrição, aumento da pressão sanguínea. • Midríase.
	• Inibição da motilidade gastrointestinal e redução da secreção das glândulas anexas.
	• Contração da bexiga e do útero.
	• Inibição da motilidade gastrointestinal. • Inibição da secreção de renina e dos hormônios pancreáticos. • Redução da secreção de noradrenalina. • Agregação plaquetária.
β	• Aumento da frequência cardíaca e da força de contração do miocárdio.
	• Inibição da motilidade gastrointestinal. • Relaxamento da bexiga e do útero. • Aumento da secreção de renina.
	• Vasodilatação, diminuição da pressão sanguínea. • Relaxamento da musculatura dos brônquios.
	• Aumento da secreção das glândulas sudoríparas. • Aumento da secreção dos hormônios pancreáticos, glicogenólise e gliconeogênese. • Aumento da secreção de noradrenalina.
	• Mobilização lipídica, lipólise.

Os órgãos imunológicos primários (medula óssea, timo) e secundários (baço, linfonodos, tecidos linfoides associados a mucosas) são inervados por fibras simpáticas (Lubahn *et al.*, 2014). Diversas células imunes expressam ARs, e são, portanto, responsivas a catecolaminas. As respostas dos ARs em células imunes possuem caráter predominantemente imunossupressor, variando de acordo ao tipo celular e aos receptores estimulados (Sanders *et al.*, 2012, Sharma e Farrar, 2020). A sinalização dos β ARs, especialmente dos β 2ARs, que possuem maior afinidade à NE secretada pelo SNS, está associada a efeitos anti-inflamatórios (Sternberg, 2006; Sanders *et al.*, 2012; Pavlov *et al.*, 2018). A cascata intracelular do receptor envolve a ativação de AMP cíclico e proteína quinase A, suprimindo a translocação nuclear do NF- κ B, com inibição da produção de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α e IL-6, e aumento da produção de moléculas anti-inflamatórias, incluindo IL-10 e TGF- β (Elenkov *et al.*, 2002). Por outro lado, a sinalização através α ARs em monócitos e macrófagos pode resultar no aumento da produção de TNF- α , IL-1, IL-6 e IL-12 (Grisanti *et al.*, 2011; Pavlov *et al.*, 2018).

Expressão adrenérgica na resposta imune inata

A imunidade inata representa a primeira linha de defesa contra patógenos, reagindo rapidamente a insultos. Os componentes do sistema imune inato incluem as barreiras físicas e químicas naturais, o sistema complemento, e células inflamatórias como monócitos e macrófagos, células dendríticas, neutrófilos e células *natural killer*.

Monócitos e macrófagos

Monócitos e macrófagos representam as principais células apresentadores de antígenos (APCs), sendo conhecidos por sua atividade fagocítica, secreção de citocinas e modulação da resposta inflamatória. Estas células expressam receptores adrenérgicos dos tipos α 1, α 2 e β 1 e β 2 (Chhatar e Lal, 2021) e há indícios de participação destes receptores na resposta imune. Experimentos *in vitro* com macrófagos de baço e linfonodos mostraram que, via β ARs, NE pode reduzir drasticamente a secreção de TNF- α em resposta a LPS (lipopolissacarídeos) (Ignatowski *et al.*, 1996). Outros estudos *in vitro* demonstraram que a ativação de α ARs com

EP e agonistas específicos exerce efeito estimulador na produção de TNF- α em resposta a LPS (Grisanti *et al.*, 2011). No entanto, a ativação *in vivo* do SNS por estresse ou estímulos inflamatórios inibe a função dos macrófagos esplênicos, indicando uma dominância de β ARs nessas células. (Meltzer *et al.*, 2004; Nance e Sanders, 2007).

Estudos sugerem que a ativação de β 2AR pode diminuir a polarização do macrófago M1 pró-inflamatório e induzir a diferenciação de macrófagos M2 anti-inflamatórios (Grailer *et al.*, 2014; Bacou *et al.*, 2017). Um estudo *in vitro*, por meio de qPCR, demonstrou que macrófagos RAW264.7 pré-tratados com NE antes de estímulo por LPS tiveram expressão reduzida do mRNA da enzima iNOS (óxido nítrico síntase induzível), característica de macrófagos M1, responsável pela produção de óxido nítrico. Ao mesmo tempo, essas células exibiram expressão aumentada do mRNA de Arg-1, enzima característica de macrófagos M2, responsável pela catalisação de arginina em ornitina, um precursor de moléculas que participam na cicatrização de feridas (Wu *et al.*, 2022). Em crianças gravemente queimadas, o número de monócitos M2 circulantes foi reduzido pelo propranolol, um β -antagonista, de forma que a suscetibilidade a infecções oportunistas também foi reduzida (Kobayashi *et al.*, 2011).

Em macrófagos, a estimulação por NE reduz as atividades fagocíticas via α ARs e β ARs, enquanto a função quimiotática é dependente de α ARs (García *et al.*, 2003). Embora a estimulação de AR não tenha influenciado na internalização de *Mycobacterium tuberculosis* em macrófagos pulmonares, o estímulo específico de α 2AR aumentou a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) nessas células, o que poderia contribuir para eliminar esses microrganismos (Deo *et al.*, 2013; Barrios-Payán *et al.*, 2016). Ainda não é claro quais as condições específicas que influenciam a ativação de α ARs e β ARs em diferentes tipos de estímulos antigênicos.

Células dendríticas

Células dendríticas (DC) são potentes APCs e secretoras de citocinas. Expressam também os receptores adrenérgicos dos tipos α 1, α 2 e β 1 e β 2 (Chhatar e Lal, 2021). Estudos demonstraram em modelo murino, que a estimulação por NE reduz a produção de IL-12, enquanto hiperestimula a secreção de IL-10 nestas células. Adicionalmente, a migração de DC foi estimulada por sinalização de α 1AR e inibida por β 2AR em ambos tecidos linfoides e não-linfoides (Maestroni, 2004; Devi *et al.*, 2021).

A administração *in vitro* de isoprenalina, um β -agonista, em células derivadas da medula óssea, é capaz de inibir a expressão das moléculas de superfície CD86 e MHC-II, reduzir o estímulo para proliferação de linfócitos T induzido por DC, além de promover a fagocitose de antígenos por DC e a secreção de IL-10 (Wu *et al.*, 2016). Já o uso *in vitro* do β 2-agonista clenbuterol demonstrou que o estímulo β 2AR inibe a diferenciação de DC e a secreção de TNF- α , além de aumentar a produção de IL-10 (Giordani *et al.*, 2015). Além disso, a sinalização de β 2AR em DC humanas ativadas por CD40 reduz o nível de IL-12, alterando o perfil leucocitário de Th1 para Th2 (Panina-Bordignon *et al.*, 1997).

Neutrófilos

Neutrófilos são as células mais numerosas do sistema imune inato, sendo atuantes principalmente contra infecções bacterianas. Os neutrófilos expressam receptores dos tipos α 1, α 2, β 1 e β 2, sendo este último o predominante (Kim *et al.*, 2014; Scanzano *et al.*, 2015). A estimulação com EP, NE ou isoprenalina (β -agonista) é capaz de reduzir as respostas de neutrófilos, diminuindo a expressão de CD11b e CD18, a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e a migração celular. Com o antagonismo de β ARs, a produção de ROS foi revertida, demonstrando que esses receptores são importantes na produção dessas substâncias (Scanzano *et al.*, 2015).

Interessantemente, o estímulo *in vivo* tanto dos β 1- quanto dos β 2ARs resultou na produção e liberação erroneamente precoce de ROS pelo neutrófilos, resultado na exaustão destas células e menor eficácia no controle de infecção por *Listeria monocytogenes* (Zieziulewicz *et al.*, 2013). NET (armadilha extracelular de neutrófilos), aglomerados de cromatina modificada com grânulos citoplasmáticos e proteases, exercem papel importante na estase e eliminação de bactérias. Foi demonstrado que EP previne a formação de NET induzida por estímulo adrenérgico, provavelmente através da ativação de β 2ARs (Marino *et al.*, 2018).

Células natural killer

Células *natural killer* (NK-C) são conhecidas por sua excelência em citotoxicidade, sendo fundamentais na imunidade inata contra vírus e tumores (Paul *et al.*, 2016; Paul e Lal,

2017). Estas células expressam receptores dos tipos $\alpha 1$ e $\alpha 2$ em baixa densidade e $\beta 2$ em altíssima densidade (Landmann, 1992; Jetschmann *et al.* 1997).

Foi demonstrado que a ativação de $\beta 2AR$ em NK-C por NE e β -agonistas varia conforme a dose e o período de exposição. Baixas doses de NE em curtos períodos de tempo intermitentes (ex. exercício físico) resultam em aumento na capacidade citotóxica e da migração de NK-C no sangue, que se realocam nos tecidos após o fim da sinalização (Bigley *et al.*, 2015; Graff *et al.*, 2018). A rápida mobilização de NK-C e linfócitos $CD8^+$ é considerada uma característica da resposta de “fuga ou luta”, na qual o sistema imune prepara o organismo para combater potenciais lesões (Dhabhar *et al.*, 1995; Dhabhar e McEwen, 1996; Dhabhar, 2009). De forma divergente, doses de NE em longos períodos de tempo (ex. estresse crônico) levam à dessensibilização de NK-C, que internalizam os ARs, inibindo a migração e a ativação de mecanismos citotóxicos (Stefanski e Ben-Eliyahu, 1996; Gan *et al.*, 2002; Graff *et al.*, 2018).

Camundongos tratados com $\beta 2$ -agonistas demonstraram maior susceptibilidade à infecção pelo citomegalovírus murino (MCMV), conhecido por infectar e modular a resposta de linfócitos efetores (NK-C e $CD8^+$) (Wieduwild *et al.*, 2020). A ausência de $\beta 2ARs$ prejudicou a expansão de NK-C e a formação de memória imune durante a infecção por MCMV. Dessa forma, foi demonstrado que a sinalização $\beta 2AR$ tem papel importante na função normal das NK-C ao MCMV (Diaz-Salazar *et al.*, 2020). O mecanismo envolvido na resposta antiviral mediada por NK-C ainda é incerto, sendo necessárias futuras pesquisas na área (Chhatar e Lal, 2021; Simpson *et al.*, 2021).

Expressão adrenérgica na resposta imune adaptativa

A imunidade adaptativa ou adquirida é a parte do sistema imune composta por células e processos sistêmicos altamente especializados, que eliminam patógenos ou impedem seu crescimento. É compreendida por diversas linhagens de linfócitos T e B, responsáveis por secreção de fatores pró-inflamatórios, reguladores e de anticorpos.

Linfócitos T

Os linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ expressam ARs de diferentes tipos, com predomínio de β 2ARs (Sanders *et al.*, 2012; Araujo *et al.*, 2019). Curiosamente, a expressão de ARs é suprimida em células Th2 devido a uma modificação epigenética (Sanders *et al.*, 2012).

A secreção de IFN- γ por linfócitos T CD4⁺ é dependente do tempo da ativação adrenérgica em relação à ativação celular: se o estímulo ocorre antes, durante e após a ativação celular, leva a uma secreção menor, inalterada ou maior de IFN- γ (Sanders *et al.*, 2012), respectivamente. A ativação de β 2AR em linfócitos T CD4⁺ na presença de IL-12 resultou em maior secreção de IFN- γ em comparação a células sem estímulo adrenérgico (Swanson *et al.*, 2001; Sanders *et al.*, 2012). Resultado semelhante foi observado em células T CD4⁺ cultivadas na presença de IL-4 e estímulo β 2AR, o que diminuiu a quantidade de IL-4 secretada pelas células Th2 que se desenvolveram (Sanders *et al.*, 2012).

Achados sugerem que o SNS reduz a capacidade das APCs de ativar as células T CD8⁺ virgens. A sinalização adrenérgica em células T CD8⁺ reduz a expressão de receptores GLUT1 e interfere na captação de glicose, tornando as células anérgicas (Qiao *et al.*, 2019). Os estudos também mostraram que as respostas de linfócitos T CD8⁺ ao vírus da Influenza são aumentadas pela administração de um β 2-antagonista, mas não β 1 ou α , demonstrando um papel crítico da resposta β 2 adrenérgica na limitação de células T CD8⁺ (Grebe *et al.*, 2009).

Devi *et al.* (2021) evidenciaram, por meio de microscopia intravital em linfonodos, que a administração de NE em camundongos inibe transitoriamente a locomoção de linfócitos CD4⁺ e CD8⁺, induzindo vasoconstrição e diminuição do fluxo sanguíneo local, o que resultou em hipóxia abrupta, desencadeando rápido influxo de cálcio nos leucócitos, interrompendo a motilidade celular. O mesmo estudo verificou que o tratamento com agonistas dos β ARs reduziu as respostas das células T contra o herpesvírus simplex tipo-I (HSV-1) e o parasita da malária *Plasmodium berghei*, assim como ações antitumorais. Essa paralisia rápida dos leucócitos explica, em parte, a relação amplamente observada entre estresse e imunossupressão, e como o SNS afeta o curso de diversas doenças (Pavlov *et al.*, 2018; Devi *et al.*, 2021).

Linfócitos B

Os linfócitos B são importantes células da resposta imune adaptativa, responsáveis pela secreção de imunoglobulinas (Ig). Os linfócitos B expressam ARs exclusivamente do tipo β

(Kohm e Sanders, 2001; Sanders *et al.*, 2012). A falta de expressão β 2ARs em linfócitos Th2 indica que alterações nos níveis séricos de Ig se devem exclusivamente aos receptores em linfócitos B (Kohm e Sanders, 1999; Sanders *et al.*, 2012).

Um estudo no qual camundongos foram submetidos a simpactetomia com 6-hidroxidopamina (6-OHDA) e posteriormente receberam transferência de linfócitos Th2 e B antígeno-específicos, mostrou que a perda de norepinefrina resultou em menor expressão de IgG1 após a administração do antígeno. Foi demonstrado menores níveis séricos de IgM e IgG, sendo revertido após a administração de um β -agonista (Kohm e Sanders, 1999). O estudo demonstrou que a depleção de catecolaminas levou à diminuição da expansão de folículos e de centro germinativos no baço (Kohm E Sanders, 1999; Podojil e Sanders, 2005; Sanders *et al.*, 2012).

A resposta adrenérgica no sistema imune inato e adaptativo está sumarizada na tabela 2.

Tabela 2: Função dos receptores adrenérgicos em células do sistema imunológico

Tipo celular	Função	Referências
Monócitos e macrófagos	+βAR: ↓TNF-α ↓Fagocitose ↓Secreção de quimiocinas	Ignatowski <i>et al.</i> , 1996; García <i>et al.</i> , 2003
	+β2AR: Polarização M1 → M2	Grailer <i>et al.</i> , 2014; Bacou <i>et al.</i> , 2017; Wu <i>et al.</i> , 2022
	+α2AR: ↑ROS	Deo <i>et al.</i> , 2013; Barrios-Payán <i>et al.</i> , 2016
Células dendríticas	+βARs: ↓MHC-II ↓proliferação de linfócitos T induzida ↑Fagocitose ↑IL-10	Wu <i>et al.</i> , 2016
	+β2ARs: ↓IL-12 ↑IL-10 ↓ Motilidade ↓diferenciação ↓TNF-α Polarização Th1 → Th2	Panina-Bordignon <i>et al.</i> , 1997; Maestroni, 2004; Giordani <i>et al.</i> , 2015; Devi <i>et al.</i> , 2021
	+α1ARs: ↑ Motilidade	Maestroni, 2004
Neutrófilos	+βARs: ↓CD11b ↓CD18 ↓ROS ↓Migração celular ↑Exaustão celular ↓NETosis	Zieziulewicz <i>et al.</i> , 2013; Scanzano <i>et al.</i> , 2015; Marino <i>et al.</i> , 2018
Células natural killer	+β2ARs (baixa dose/duração): ↑Citotoxicidade ↑Migração	Stefanski e Ben-Eliyahu, 1996; Gan <i>et al.</i> , 2002; Bigley <i>et al.</i> , 2015; Graff <i>et al.</i> , 2018
	+β2ARs (alta dose/duração) ↓Citotoxicidade ↓Migração	
	+β2ARs ↑Susceptibilidade ao Citomegalovírus murino	Wieduwild <i>et al.</i> , 2020
Linfócitos T	-β2ARs: ↓ Diferenciação	Diaz-Salazar <i>et al.</i> , 2020
	+βARs: ↓GLUT1 ↓Motilidade ↑Susceptibilidade a agentes infecciosos e tumores	Qiao <i>et al.</i> , 2019; Devi <i>et al.</i> , 2021
Linfócitos B	+β2ARs: ↑IL-12 ↓IL-4	Swanson <i>et al.</i> , 2001; Sanders <i>et al.</i> , 2012
	-β2ARs: ↓IgG1 ↓IgM ↓Diferenciação ↓CD86	Kohm e Sanders, 1999; Podojil e Sanders, 2005

+: estímulo; -: ausência/inibição; ARs: receptores adrenérgicos; TNF-α: fator de necrose tumoral alfa; ROS: espécies reativas de oxigênio; MHC: complexo principal de histocompatibilidade; IL: interleucina; NETosis: síntese de amardilha extracelular de neutrófilos; GLUT: transportador de glicose; Ig: imunoglobulina

Sinalização adrenérgica e sepse

A inflamação é um mecanismo fisiopatológico necessário para a sobrevivência frente a distúrbios da homeostase. Para tal, as células imunes secretam substâncias que são lesivas não somente para patógenos, como potencialmente ao próprio organismo, e, dessa forma, o equilíbrio entre fatores pró e anti-inflamatórios se faz necessário. Juntamente aos conhecidos mecanismos de imunotolerância e supressão mediada por citocinas, a sinalização adrenérgica é uma potente via supressora de células imunes e da secreção de citocinas (Sharma e Farrar, 2020;

Chhatar e Lal, 2021). Essa afirmativa é corroborada em experimentos e ensaios clínicos sobre o efeito de β 2ARs frente a quadros sépticos (Van Der Pool *et al.*, 1996; Grailer *et al.*, 2014; Pollard *et al.*, 2015; Stolk *et al.*, 2016; Li *et al.*, 2020; Stolk *et al.*, 2020).

A septicemia, e consequente apresentação de LPS às células imunes inatas, gera uma secreção abundante de citocinas pró-inflamatórias, resultando na Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica (SIRS), uma cascata hiperinflamatória que lesa gravemente o organismo (Stolk *et al.*, 2020; Chhatar e Lal, 2021). A administração de NE e β 2-agonistas pode reduzir drasticamente a secreção de TNF- α por macrófagos em estímulo a LPS. O estímulo de β 2ARs induz a secreção de elevada quantidade de IL-10, antagonista de TNF- α e IFN- γ . Modelos experimentais com depleção de β 2ARs e estimulação por LPS resultaram em baixa expressão de IL-10 e altos níveis séricos de TNF- α , além de elevada letalidade, quadro que foi revertido com a administração exógena de IL-10 (Grailer *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2020).

De forma semelhante, pacientes humanos em quadros sépticos que foram tratados precocemente com EP ou NE para manutenção da pressão sanguínea, apresentaram melhores índices de sobrevivência a curto prazo. Esses pacientes apresentaram diferente perfil de citocinas, com maiores níveis de IL-10 e menores de TNF- α , indicando o papel da regulação neurológica no sistema imune (Pollard *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2020). Paradoxalmente, os mecanismos suprimidos pelas catecolaminas são também responsáveis pelo controle da proliferação bacteriana, o que representa risco a longo prazo (Stolk *et al.*, 2016; Stolk *et al.*, 2020). Entretanto, a administração de EP e NE de forma adjuvante no tratamento de sepse forneceu melhora clínica pela restauração da pressão sanguínea e supressão das lesões por SIRS (Stolk *et al.*, 2020).

Estresse, catecolaminas e imunossupressão

O termo “estresse” é definido como “uma ruptura real ou antecipada da homeostase ou uma ameaça antecipada ao bem-estar” (Ulrich-Lai e Herman, 2009). As informações relacionadas ao estresse são transmitidas ao cérebro a partir dos sistemas sensoriais, podendo assumir a forma de sinais introceptivos (ex. volume sanguíneo e osmolaridade) ou extroceptivos (ex. o cheiro de um predador), que recrutam os sistemas nervoso e neuroendócrino para minimizar possíveis danos (Ulrich-Lai e Herman, 2009). A resposta biológica ao estresse desencadeia o SNS e o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, liberando doses sistêmicas de

catecolaminas e glicocorticoides, respectivamente. Esses compostos transmitem sinais para uma enorme variedade de tipos celulares, incluindo àquelas do sistema imune (Kohm e Sanders, 2001; Steinman, 2004). É notório que o excesso de estímulos estressantes, tanto de forma aguda quanto crônica, é responsável por imunossupressão e maior susceptibilidade a infecções. Para além dos efeitos supressivos dos glicocorticoides, foi comprovado que a atuação exacerbada das catecolaminas também é prejudicial à imunidade (Takahashi *et al.*, 2018; Seiler *et al.*, 2020; Simpson *et al.*, 2021).

A modulação do sistema imunológico via estímulos estressantes é dependente da dose de catecolaminas liberadas, frequência e tempo de ação. Modelos de estresse psicológico agudo (ex. falar em público) ou administração de epinefrina em humanos evidenciaram linfocitose com mobilização preferencial de subtipos citotóxicos (células NK, células T CD8+) (Anane *et al.*, 2009). Além disso, a linfocitose pode ser bloqueada pela administração de antagonistas β AR não seletivos, mas não por β 1-antagonistas, revelando que os efeitos são mediados pelo β 2AR (Graff *et al.*, 2018; Baker *et al.*, 2020). De forma divergente, estímulos estressantes agudos intensos (ex. morte de ente querido) ou crônicos (ex. divórcio, depressão, estresse laboral) têm sido associados à redução da função imunológica (Bonneau *et al.*, 1990), sendo destacadas deficiências na função celular, como linfopenia e menores respostas de células T à estimulação por mitógenos e secreção de citocinas (Denney *et al.*, 1988; Kiecolt-Glaser *et al.*, 1988).

A ativação crônica de catecolaminas, observada em modelos de estresse prolongado, é conhecida por causar dessensibilização de β ARs, promovendo inflamação e reduzindo a vigilância imunológica, aumentando potencialmente o risco de infecções (Padro e Sanders, 2014; Koopman *et al.*, 2017). Prösch e colaboradores sugeriram que a estimulação adrenérgica contínua contribui para risco aumentado de infecções virais, como o herpesvírus humano tipo-1 e o vírus da varicela (Prösch *et al.*, 2000). A exposição prolongada de células às catecolaminas resulta em inativação, sequestro ou regulação negativa dos ARs, ações regulatórias com intuito de proteger a célula da estimulação excessiva (Pavlos e Friedman, 2017).

NE, cortisol e depressão foram demonstrados como fatores predisponentes à progressão da infecção por vírus da imunodeficiência humana (HIV), induzindo uma taxa significativamente menor de linfócitos CD4⁺ e aumento da carga viral, indicando um efeito

robusto do estresse crônico na progressão da doença (Grebe *et al.* 2010). A resposta crônica ao estresse desencadeia a reativação de vários herpesvírus latentes, e a EP foi considerada um fator responsável por reativar esses vírus em células epiteliais infectadas, via $\beta 2ARs$ em células CD8⁺ (Simpson *et al.*, 2016). Em estudos sobre a influência das catecolaminas em feridas cutâneas, a exposição crônica à EP resultou em tráfego persistente de neutrófilos para o local da ferida através de IL-6, secretada por macrófagos em estímulo $\beta 2AR$, resultando em prejuízo ao reparo tecidual (Kim *et al.*, 2014).

2.2 *Listeria monocytogenes*

Listeria monocytogenes é uma bactéria gram-positiva, cocobacilar flagelada, não-esporulada, intracelular facultativa e saprófita. É a espécie mais importante do gênero *Listeria* por ser um patógeno zoonótico em seres humanos e animais, nos quais causa a infecção conhecida como listeriose (Vazquez-Boland *et al.*, 2001; Dhama *et al.*, 2015; Lecuit, 2020; Koopmans *et al.*, 2023). *L. monocytogenes* é considerado um microrganismo ubíquo, presente amplamente em ambientes agrícolas, corpos hídricos e na indústria de processamento de alimentos (Strawn *et al.*, 2013). É capaz de colonizar plantas, ser ingerido por animais herbívoros, atingir o lúmen intestinal, competir com a microbiota intestinal e ser eliminado de forma assintomática no ambiente através das fezes. Tem a capacidade de aderir e invadir o epitélio intestinal e monócitos/macrófagos, e se replicar nos linfonodos mesentéricos, baço, fígado, útero e encéfalo, além de conseguir se translocar da mucosa oral para os nervos cranianos, fazer migração axonal retrógrada e invadir o rombencéfalo (Bakardjiev *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2017; Lecuit, 2020). É responsável por infecções do sistema nervoso central e trato reprodutivo, com desenvolvimento de casos de meningoencefalite, aborto e infecção neonatal septicêmica (Poston e Kurlander, 1992; Lecuit *et al.*, 2007; Buchrieser *et al.*, 2011; Bergman *et al.*, 2013; Frande-Cabanes *et al.*, 2013; Koopmans *et al.*, 2023).

Biologia

L. monocytogenes pode tolerar uma ampla faixa de pH e temperatura. O crescimento ideal ocorre a 30-37 °C, mas o organismo pode multiplicar-se a 2-45 °C e em pH 4,5 a 9,6. Apesar de sua multiplicação ser mínima em baixas temperaturas (2-8 °C), *L. monocytogenes*

prevalece em refrigeração devido à competição com outras bactérias que tem maior dificuldade de crescimento nessa faixa de temperatura. (Juntilla *et al.* 1988; Barbuddhe *et al.*, 2012; Dhama *et al.*, 2015; Bhunia, 2018; OIE, 2018). *L. monocytogenes* é relativamente resistente a outras condições ambientais como alto teor de sal (10%) e sanitizantes comuns, como amônio quaternário. A bactéria pode permanecer viva fora do corpo dos hospedeiros em ambiente úmido por vários anos (Dhama *et al.*, 2015; OIE, 2018).

Epidemiologia

L. monocytogenes foi descoberta na década de 1920, como causa de infecção sistêmica em coelhos e porquinhos-da-Índia de laboratório (Murray *et al.*, 1926) e em gerbilos selvagens (Pirie, 1927). Após a Segunda Guerra Mundial, começou a ser considerado um importante patógeno humano, responsável por infecções fatais do sistema nervoso central e reprodutivo. A sua origem como patógeno alimentar foi formalmente comprovada na década de 1980, através de investigação epidemiológica de um grande surto nos EUA e Canadá, que estava ligado à ingestão de repolho contaminado (Schlech *et al.*, 1983; Lecuit, 2020). Desde então, a infecção já foi associada a diversos alimentos, particularmente aqueles classificados como “prontos para consumo”, ou seja, que não necessitam de cozimento ou aquecimento para ingestão, como: leite e derivados, principalmente queijos artesanais e produtos não-pasteurizados, incluindo sorvetes; carnes embutidas; patê; frutos-do-mar; vegetais em conserva e verduras cruas (FAO e WHO, 2004; Buchanan *et al.*, 2017; CDC, 2023).

L. monocytogenes se tornou um importante patógeno de origem alimentar na segunda metade do século XX, fato que é atribuído a: (1) industrialização da produção de alimentos e a consequente maior distribuição de contaminantes, sendo esse fator ainda mais importante em países subdesenvolvidos e com legislação sanitária precária; (2) o maior acesso da indústria e população a equipamentos de refrigeração, os quais fornecem condições favoráveis de competição e crescimento a *L. monocytogenes*; (3) a maior disponibilidade de terapias medicamentosas imunossupressoras, e o prolongamento da sobrevida de pacientes com doenças crônicas debilitantes (Schlech *et al.*, 1983; Lecuit, 2020; Thomas *et al.*, 2020).

Sabe-se que a listeriose acomete principalmente pessoas com o sistema imunológico comprometido, como idosos, gestantes, crianças e portadores de doenças imunossupressoras, como síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS), lúpus eritematoso sistêmico, cirrose

hepática e neoplasias malignas (Schlech, 2000; Vázquez-Boland *et al.*, 2001; Mclauchlin *et al.*, 2004; Alam *et al.*, 2016; Koopmans *et al.*, 2023). Foi estipulado que a dose infectante de *L. monocytogenes* em humanos saudáveis está em torno de 1×10^7 CFU, sendo consideravelmente menor, 1×10^4 CFU, em indivíduos imunossuprimidos (FAO e WHO, 2004; Todd e Notermans, 2011). Acredita-se que a ingestão de *Listeria* seja predominantemente assintomática em humanos, uma vez que a incidência de listeriose humana é baixa (0,1–10 casos/milhão), apesar de exposições frequentes e repetidas à bactéria. No entanto, em indivíduos imunossuprimidos, a listeriose pode apresentar quadro grave, que podem exibir até 30% de mortalidade (FAO e WHO, 2004; Koopmans *et al.*, 2023).

A infecção por *L. monocytogenes* já foi descrita em diversas espécies animais, como ovinos, caprinos, bovinos, búfalos, cavalos, camelos, cães, roedores, galináceos, perus, pombos e aves de rapina (Dhama *et al.*, 2013; Dhama *et al.*, 2015; OIE, 2018). Os animais de produção, especialmente ovinos, são mais afetados e de importância epidemiológica (OIE, 2018). Ruminantes são considerados reservatórios naturais da bactéria (Rocha *et al.*, 2013). Os animais se infectam pela via oral, através do consumo de alimentos ou água contaminados, e eliminam o agente no ambiente pelas fezes, fetos abortados e secreções oronasais (Brugère-Picoux, 2008; OIE, 2018). Uma forma de infecção, considerada rara, é pela inalação direta ou indireta de partículas bacterianas (OIE, 2018). A infecção está também relacionada ao consumo de silagem mal fermentada (pH > 5,0) por animais de confinamento em período de seca (Brugère-Picoux, 2008).

Patogênese

Listeria monocytogenes é um agente notoriamente conhecido pela sua capacidade de ser internalizado tanto em fagócitos quanto não-fagócitos, principalmente enterócitos, através de suas duas principais internalinas, InlA e InlB (Gaillard *et al.*, 1991). InlA tem como receptor a E-caderina (Ecad), proteína de junção intercelular expressa em células epiteliais, dendríticas e da glia (Mengaud *et al.*, 1996). Cepas mutantes com ausência de InlA são consideradas incapazes de causar infecção via oral em modelos susceptíveis (Gaillard *et al.*, 1991). Curiosamente, camundongos *wild type* não são modelos viáveis para infecção oral por *L. monocytogenes*, uma vez que a Ecad expressa em suas células epiteliais tem composição de aminoácidos diferente da observada em humanos, gerbilos e porquinhos-da-Índia (Lecuit *et*

al., 1999). Por sua vez, InlB tem como ligante o receptor de fator de crescimento de hepatócito (c-Met), proteína de membrana expressa em células epiteliais e endoteliais (Dramsi *et al.*, 1995). InlB não está envolvido na internalização em enterócitos (Khelef *et al.*, 2008), porém é fundamental para a infecção de hepatócitos (Dramsi *et al.*, 1995). Foi demonstrado que ambas internalinas são necessárias para o cruzamento da barreira uteroplacentária e infecção uterina (Disson *et al.*, 2008).

A infecção por *L. monocytogenes* no sistema nervoso central (CNS) possui duas apresentações distintas: rombencefalite e meningoencefalite (Disson e Lecuit, 2012). A rombencefalite, forma mais comumente observada em ruminantes e ocasional em humanos, tem como porta de entrada o epitélio oral lesado, permitindo infecção dos nervos cranianos, principalmente o trigêmeo, pelos quais a bactéria é capaz de fazer migração axonal retrógrada, ganhando acesso ao tronco encefálico (Antal *et al.*, 2001; Oevermann *et al.*, 2011). Diferentemente, a meningoencefalite, mais comum em humanos, tem sua infecção por via hematogênica, ocorrendo transposição da barreira hematoencefálica (Disson e Lecuit, 2012; Koopmans *et al.*, 2023). Essa via de infecção ainda não é bem esclarecida, podendo hipoteticamente ocorrer de duas formas: (1) a bactéria, livre no sangue, se liga à Ecad ou C-Met de células endoteliais e astrócitos, realizando transmigração; ou (2) a bactéria internalizada em fagócitos ganha acesso ao CNS pela diapedese dessas células (Kim, 2008). Independentemente da via de acesso ao CNS, o patógeno consegue se internalizar em astrócitos, oligodendrócitos e células da micróglia, uma vez que essas expressam Ecad (Madaramé *et al.*, 2011).

Uma vez fagocitada por monócitos/macrófagos, a propagação de *Listeria* depende da sua sobrevivência intracelular, mediada por fatores de virulência como LLO (listeriolisina O) e ActA (proteína indutora da montagem de actina) (Schnupf e Portnoy, 2007; Levraud *et al.*, 2009). LLO é uma toxina formadora de poros que, durante o ciclo intracelular de *L. monocytogenes*, é responsável por degradar as moléculas de colesterol que constituem a membrana do fagossomo, rompendo o mesmo, permitindo assim o acesso da bactéria ao citosol, onde se replica ativamente (Portnoy *et al.*, 1988; Meehl e Caparon, 2004; Schnupf e Portnoy, 2007). Uma vez no citosol, a atividade de LLO é intrinsecamente regulada, por meio de redução da transcrição e inatividade pelo aumento de pH, para evitar a ruptura da membrana citoplasmática da célula hospedeira (Bubert *et al.*, 1999; Glomski *et al.*, 2002). Já ActA tem como funções a polimerização da actina do citoesqueleto, impedindo que *Listeria* livre no

citosol sofra autofagia e alterando a conformação da célula hospedeira de forma a gerar pseudópodos que permitem que as bactérias sejam fagocitadas por células vizinhas, sem sofrer influências do meio extracelular (Kocks *et al.*, 1992; Travier e Lecuit, 2014).

Manifestação clínica

A listeriose em humanos manifesta-se nas formas invasiva e não-invasiva. A forma invasiva é caracterizada por septicemia, infecções do sistema nervoso central e materno-fetais, e está frequentemente associada a pacientes imunossuprimidos (FAO e WHO, 2004; Koopmans *et al.*, 2023). Em estudo de coorte realizado na França, onde está implementada uma sistemática vigilância sanitária, a septicemia representa cerca de 50% dos casos, a neurolisteriose 30%, as infecções materno-fetais 10% e tipos raros de infecções (respiratória, cutânea, entre outros) combinadas 10%. O mesmo estudo identificou taxa de mortalidade de 46% em casos septicêmicos e 30% em casos neurológicos, com apenas 40% dos pacientes neurológicos sobreviventes exibindo recuperação total (Charlier *et al.*, 2017). Outro estudo, que avaliou 782 casos de listeriose notificados em 20 países, incluindo países desenvolvidos e em desenvolvimento, demonstrou que 43% das infecções eram gestacionais e 57% eram casos não-gestacionais, que poderiam ser categorizadas como: 29% infecções septicêmicas, 24% infecções do sistema nervoso central e 4% de formas atípicas (Rocourt *et al.*, 1991). Em surto recente na África do Sul, detectado entre junho de 2017 e abril de 2018, foram identificados 937 casos de listeriose humana. Destes, 465 (~50%) estavam associados a gestantes e neonatos. Entre os pacientes cuja sorologia de HIV era conhecida, 38% dos casos em gestantes/neonatos e 46% dos demais pacientes estavam infectados com HIV, demonstrando a alta correlação entre a manifestação de listeriose e imunossupressão. Entre 728 pacientes com desfecho conhecido, 193 (27%) morreram. Em análise de isolados clínicos e caso-controle, foi observado uma alta correlação entre o consumo de mortadela e a infecção por *L. monocytogenes*, sendo a mesma cepa isolada de amostras de humanos e do alimento (Thomas *et al.*, 2020).

Embora a listeriose materno-fetal raramente leve à mortalidade materna ou neurolisteriose (<1%) (Thomas *et al.*, 2020; Koopmans *et al.*, 2023), mais de 80% das gestações cursam com importantes complicações fetais ou neonatais, como: aborto, prematuridade e doença septicêmica infantil (Charlier *et al.*, 2017; Koopmans *et al.*, 2023). Em contraste com a

listeriose materno-fetal, a bacteremia e a neurolisteriose estão quase constantemente associadas a comorbidades imunossupressoras (Charlier *et al.*, 2017; Thomas *et al.*, 2020).

A forma não-invasiva da listeriose ocorre em indivíduos imunocompetentes após a ingestão de grande inóculo (>1000 CFU/g de alimento), ocorrendo uma gastroenterite autolimitante, com tempo de incubação curto (<24 h), caracterizada por diarreia, febre branda e polimialgia, raramente levando ao óbito. Dados sobre a forma não-invasiva da listeriose são escassos em virtude de os sintomas leves serem frequentemente negligenciados (FAO e WHO, 2004; Lecuit, 2020).

Em animais, a forma invasiva é mais frequentemente associada a abortos e neurolisteriose. Septicemia é observada esporadicamente em filhotes bovinos e ovinos, e geralmente leva ao óbito desses animais, sendo observadas sequelas permanentes nos raros sobreviventes (OIE, 2018). Geralmente, a doença é observada em fazendas como surtos e manifestações esporádicas de aborto em fêmeas no segundo ao terceiro trimestre da gestação, ou como surtos de animais exibindo sinais neurológicos, como andar em círculos, depressão e paralisia unilateral da face (OIE, 2018; Kennedy *et al.*, 2023). A taxa de mortalidade, mesmo com tratamento apropriado, pode chegar a 55% (Kennedy *et al.*, 2023). A forma não-invasiva ou gastroentérica é raramente relatada em ovinos (Clark *et al.*, 2004).

Lesões macroscópicas são raramente observadas em humanos e animais (Dhama *et al.*, 2015; OIE, 2018; Lecuit, 2020; Kennedy *et al.*, 2023; Koopmans *et al.*, 2023). Fetos ovinos abortados podem apresentar necrose hepática multifocal (Hoelzer *et al.*, 2012). Grandes abscessos placentários (até 3cm de diâmetro) são relativamente frequentes em casos de aborto em humanos (Topalovski *et al.*, 1993). Em humanos, lesões cerebrais focais podem ser detectadas por tomografia computadorizada ou ressonância magnética em 23 a 26% dos casos (Koopmans *et al.*, 2013). Abscessos encefálicos são raramente observados em humanos (Charlier *et al.*, 2017) e em animais (Rocha *et al.*, 2013).

Lesões microscópicas comumente relatadas no CNS são rombencefalite ou meningoencefalite supurativas, constituídas por pequenos aglomerados circulares de neutrófilos e macrófagos (microabscessos) frequentemente associados a necrose, distribuídos aleatoriamente no neurópilo, com certa predileção pelo tronco encefálico mesmo em casos hematógenos (Rocha *et al.*, 2013; Engelen-Lee *et al.*, 2018; OIE, 2018; Koopmans *et al.*, 2023). Na placenta humana, frequentemente se observa intensa inflamação supurativa da decídua, com

extensas áreas de necrose, além de ocasional vasculite e trombose dos vasos da placenta e do endométrio (Topalovski *et al.*, 1993); lesões semelhantes foram observadas em experimento materno-fetal em primatas não-humanos (Wolfe *et al.*, 2017). Microabcessos, áreas multifocais de necrose e ocasional vasculite e trombose são observados no baço e fígado de animais e humanos com listeriose subclínica (Cousens e Wing, 2000; Vázquez-Boland *et al.*, 2001; Rocha *et al.*, 2013).

Listeriose em modelo murino

O modelo murino tem sido o mais comumente usado para infecção por *L. monocytogenes* (Lecuit, 2007). Esse modelo foi utilizado pela primeira vez por Mackaness (1962), no intuito de estudar um processo infeccioso que induzisse resposta imune celular e não dependesse de anticorpos para a resolução da doença. Desde então, este modelo é amplamente difundido na comunidade científica para o estudo de infecção agudas por agentes intracelulares (North *et al.*, 1997; Lecuit, 2007; Hoelzer *et al.*, 2012).

A ampla aceitação do camundongo como modelo de listeriose é devido ao seu tamanho, facilidade de manuseio e custo econômico relativamente baixo. Além disso, a disponibilidade comercial de muitos reagentes para estudos imunológicos, os extensos dados disponíveis sobre fisiologia, anatomia, embriogênese e imunologia, e a existência de linhagens endogâmicas bem caracterizadas, contribuíram para a imensa popularidade do modelo (Lecuit, 2007; Hoelzer *et al.*, 2012). Entretanto, existem limitações consideráveis neste modelo. Por conta da mutação que possuem na Ecad, camundongos não são bons modelos para infecção oral por *L. monocytogenes*, que é a via de infecção natural (Monk *et al.*, 2010). Além disso, essa mutação da Ecad também impede a infecção placentária em modelo gravídico (Disson *et al.*, 2008). Outra limitação ocorre nos estudos sobre neurolisteriose, nos quais o modelo murino é inconsistente, uma vez que exibe difícil replicação, ocorrendo o óbito dos animais por septicemia antes da colonização do encéfalo, exceto em casos que a via de infecção é intratecal ou intracisternal (Gray e Killinger, 1966; Disson e Lecuit, 2012; Hoelzer *et al.*, 2012).

Atualmente, modelos experimentais com primatas não-humanos e gerbilos são considerados superiores ao murino, uma vez que são espécies naturalmente susceptíveis à infecção por *L. monocytogenes* por possuírem Ecad e c-Met altamente semelhantes a presentes em humanos, o que resulta em sintomatologia clínica similar (Blanot *et al.*, 1997; Disson *et al.*,

2008; Smith *et al.*, 2008). Os primatas não-humanos exibem outra vantagem que é a familiaridade filogenética com humanos e o mesmo tipo de placenta (Smith *et al.*, 2008). Entretanto, ambos modelos não são bem caracterizados como o murino, possuem limitada disponibilidade de reagentes, exigem maior investimento financeiro e, no caso dos primatas, existem regulamentos éticos muito mais rígidos (Disson e Lecuit, 2012 Hoelzer *et al.*, 2012).

3. PAPEL DOS RECEPTORES BETA-ADRENÉRGICOS NA RESPOSTA IMUNE À INFECÇÃO POR *Listeria monocytogenes* EM MODELO MURINO

3.1 OBJETIVOS

Objetivo geral: Avaliar a resposta inflamatória e imunológica de camundongos deficientes de reposta de $\beta 2AR$ s ao desafio agudo com doses sub-letais de *L. monocytogenes*.

Objetivos específicos:

1. Determinar e comparar a recuperação bacteriana em baço e fígado de camundongos WT e $\beta 2AR^{-/-}$ aos 3 dias pós infecção intraperitoneal com dose subletal de *L. monocytogenes*.
2. Avaliar e comparar as lesões histopatológicas em baço e fígado de camundongos WT e $\beta 2AR^{-/-}$ aos 3 dias pós-infecção intraperitoneal com dose subletal de *L. monocytogenes*.
3. Determinar perfil de citocinas como IL-10 e INF- γ em soro de camundongos WT e $\beta 2AR^{-/-}$ aos 3 dias pós infecção intraperitoneal com dose subletal de *L. monocytogenes*.
4. Determinar e comparar a recuperação bacteriana em baço e fígado de camundongos WT com uso de Nadolol (antagonista- βAR inespecífico) e ICI 118,551 (antagonista- $\beta 2AR$ específico) aos 3 dias pós infecção intraperitoneal com dose subletal de *L. monocytogenes*.
5. Avaliar e comparar as lesões histopatológicas em baço e fígado de camundongos WT e com uso de Nadolol (antagonista- βAR inespecífico) e ICI 118,551 (antagonista- $\beta 2AR$ específico) aos 3 dias pós-infecção intraperitoneal com dose subletal de *L. monocytogenes*.
6. Determinar perfil de citocinas como IL-10 e INF- γ em soro de camundongos WT e com uso de Nadolol (antagonista- βAR inespecífico) e ICI 118,551 (antagonista- $\beta 2AR$ específico) aos 3 dias pós infecção intraperitoneal com dose subletal de *L. monocytogenes*.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

Ética

Este estudo com camundongos foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Minas Gerais (CEUA-UFMG), sob os protocolos CEUA 29/2020 e CEUA 9/2023.

Cultivo e preparo de inóculo de *Listeria monocytogenes*

Listeria monocytogenes sorotipo 4b (ATTC 19115) foi cultivada em caldo BHI (infusão de coração cérebro, KASVI, Brasil) a 37 °C a 200 rpm durante 15h. Posteriormente, uma alíquota de 1×10^9 CFU/mL foi semeada em 20 mL de caldo BHI a 37 °C a 200 rpm durante 4h, até atingir novamente a concentração de 1×10^9 CFU/mL. A suspensão bacteriana foi centrifugada a 3000g durante 10 min, o sedimento ressuspendido em 10 mL de PBS e a concentração determinada por espectrofotometria. A concentração de suspensão bacteriana foi ajustada de acordo com cada inóculo.

Espécimes

Foram utilizados neste estudo camundongos das linhagens C57/BL6 WT obtidos no Biotério Central da UFMG e $\beta 2AR^{-/-}$ cedidos pelo Departamento de Patologia Geral do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG. Os animais foram alojados em grupos, de até seis indivíduos, dentro de caixas contendo maravalha de pinus no Complexo Laboratorial de Pesquisa Avançada em Medicina Veterinária da Escola de Veterinária da UFMG, sob temperatura de 22 °C, e ciclo luz-escuro de 12 horas. Ração e água foram fornecidos *ad libitum*. Foram fornecidos canos de policloreto de vinila como enriquecimento ambiental.

Delineamento experimental

Foram utilizados 48 camundongos, distribuídos inteiramente ao acaso em grupo de seis animais, totalizando 8 grupos, que foram divididos em dois experimentos distintos.

No Experimento 1 (conduzido em dois ensaios independentes $n=3$ e $n=6$), foram utilizados camundongos das linhagens C57/BL6 WT ($n=9$) e $\beta 2AR^{-/-}$ ($n=9$), fêmeas, com idade entre 6 e 8 semanas, distribuídos nos seguintes grupos:

G1 (WT) – camundongos WT, fêmeas, infectados por *L. monocytogenes*.

G2 (KO- $\beta 2$) – camundongos $\beta 2AR^{-/-}$, fêmeas, infectados por *L. monocytogenes*.

Todos os camundongos deste experimento foram desafiados via intraperitoneal com 100 μL 1×10^6 UFC/ml de *L. monocytogenes*. Os grupos foram observados no decorrer de todo o experimento, e cada indivíduo pesado diariamente, para avaliação da manifestação de sinais clínicos. Os camundongos foram eutanasiados após três dias de infecção. O experimento 1 está sintetizado na Figura 1.

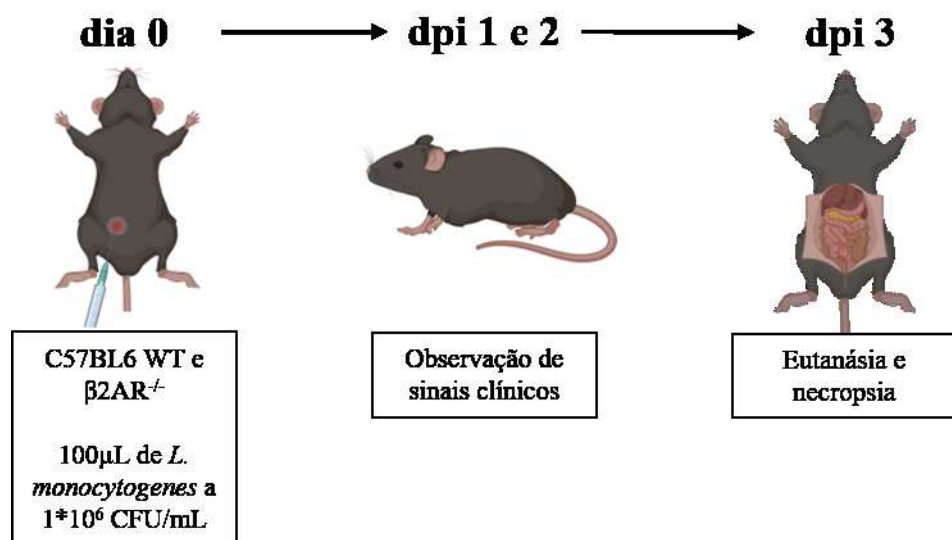


Figura 1: Fluxograma do delineamento do experimento 1.

Experimento 2: foram utilizados 36 camundongos C57/BL6 WT, fêmeas, com idade entre 6 e 8 semanas, distribuídos nos seguintes grupos:

G1 (Mock) – camundongos WT, não-infectados, com administração intraperitoneal de PBS ($n=6$);

G2 (C-Nad) – camundongos WT, não-infectados, com administração intraperitoneal de nadolol (antagonista βAR -inespecífico) ($n=6$);

G3 (C-ICI) – camundongos WT, não-infectados com administração intraperitoneal de ICI 118,551 (antagonista $\beta 2AR$ -específico) ($n=6$);

G4 (Infec.) – camundongos WT, infectados por *L. monocytogenes* com administração intraperitoneal de PBS (n=6);

G5 (In-Nad) – camundongos WT, infectados por *L. monocytogenes* com administração intraperitoneal de nadolol (antagonista β AR-inespecífico) (n=6);

G6 (In-ICI) – camundongos WT, infectados por *L. monocytogenes* com administração de ICI 118,551 (antagonista β 2AR-específico) (n=6).

Os camundongos foram desafiados via intraperitoneal com 100 μ L 1×10^6 UFC/ml de *L. monocytogenes*. Grupos controle (G1, G2 e G3) foram inoculados com mesmo volume de PBS. Para o estudo, foram utilizadas as drogas Nadolol (antagonista β AR não-específico - Sigma-Aldrich, EUA) e ICI 118,511 (antagonista β 2AR específico - Sigma-Aldrich, EUA). Os grupos G1/G4, G2/G5 e G3/G6 tiveram a primeira dose de PBS, nadolol ou ICI 118,551, respectivamente, administrada 1h antes da infecção bacteriana, e, após a infecção, a cada 12h durante todo o período experimental, de acordo ao protocolo: PBS, grupos G1 e G4, 100 μ L de solução por via intraperitoneal; Nadolol, grupos G2 e G5, 100 μ L de solução por via intraperitoneal, na concentração 10mg/kg; ICI 118,511, grupos G3 e G6, 100 μ L de solução por via intraperitoneal, na concentração 1mg/kg. O experimento 2 está sintetizado na Figura 2.

Os grupos foram observados no decorrer de todo o experimento, e cada indivíduo pesado diariamente, para avaliação da manifestação de sinais clínicos. Os camundongos foram eutanasiados após três dias de infecção.

Os camundongos de ambos experimentos foram submetidos a eutanásia no dia 3 pós-infecção por anestesia com 100 μ L de solução de Xilazina 2% (10 mg/Kg) + Cetamina 10% (100 mg/Kg) seguido de sangria por punção cardíaca, para obtenção de soro. Baço e fígado foram pesados, fragmentados, coletados em PBS estéril para maceração, plaqueamento e contagem bacteriana, e fragmentos foram coletados em formalina 10% para histopatologia e imuno-histoquímica.

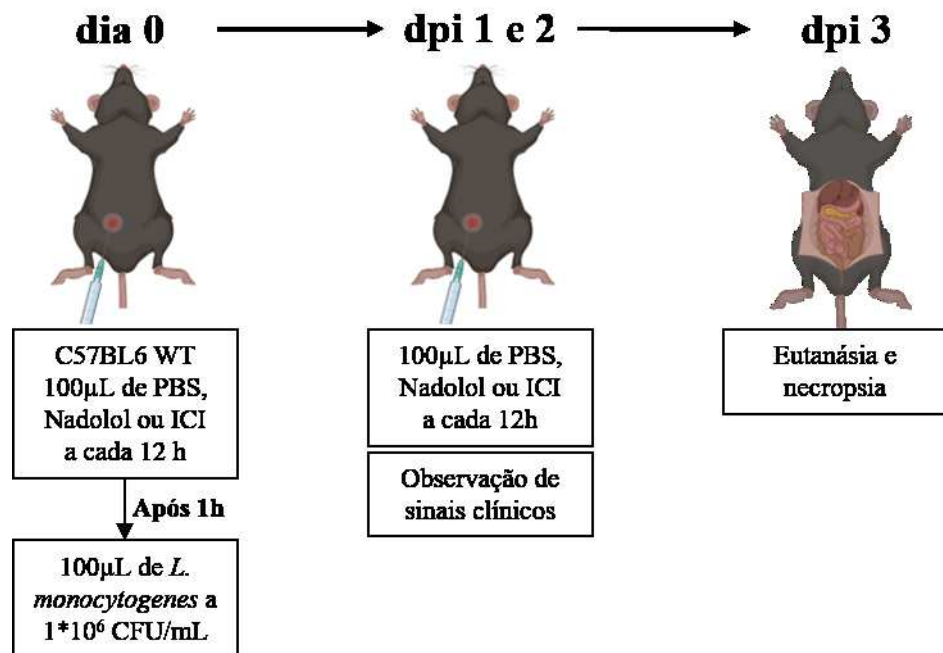


Figura 2: Fluxograma do delineamento do experimento 2.

Recuperação bacteriana

Fragmentos de baço e fígado foram coletados assepticamente e homogeneizados em PBS estéril. Diluições em série de homogenato dos órgãos foram semeadas em placas de ágar BHI e cultivadas a 37 °C por 24 horas para enumeração de colônias viáveis de *L. monocytogenes*.

Histopatologia e imuno-histoquímica

Fragmentos de baço e fígado foram fixados em formalina 10% por 24 horas, e submetidos a procedimento convencional de histotécnica para inclusão em parafina e coloração em hematoxilina-eosina. As lâminas foram analisadas em microscopia ótica, e as lesões observadas foram graduadas de acordo ao padrão utilizado por Rocha *et al.* (2021). Brevemente, a pontuação foi atribuída para lesões inflamatórias de acordo com a intensidade das lesões: 0 para ausência de lesões, 1 para leve, 2 para moderada e 3 para intensa. Também se atribuiu pontos para a presença de áreas de necrose (até +1) e de trombose (até +1). A pontuação final foi a soma das pontuações de inflamação, necrose e trombose, podendo pontuar até 5. A localização intralesional de *L. monocytogenes* em lesões esplênicas e hepáticas foi demonstrada

por imuno-histoquímica. Resumidamente, os cortes foram desparafinizados, hidratados e incubados com peróxido de hidrogênio a 10% em PBS por 30 min, seguido de incubação com leite desnatado (diluição 1:10) como solução bloqueadora por 40 min, e então incubados com um anticorpo primário policlonal anti-*L. monocytogenes* (Listeria O Poly Antiserum serotypes 1,4, Difco, EUA) em diluição de 1:500 em PBS, em câmara umidificada a 4°C, *overnight*. As lâminas foram lavadas em PBS e incubadas com anticorpo secundário biotilado (kit LSAB; DAKO Corporation, EUA) durante 30 min à temperatura ambiente e lavadas novamente em PBS. A reação foi revelada com solução Magenta (Dako) por 5 min e os cortes foram contrastados com hematoxilina de Mayer.

Mensuração de citocinas

As concentrações de interferon gama (IFN- γ) e interleucina 10 (IL-10) foram analisadas no soro coletado por punção cardíaca em placas de 96 poços usando kits ELISA de acordo com as instruções do fabricante (R&D Systems, Minneapolis, EUA). A leitura foi realizada no comprimento de onda de 490 nm utilizando o aparelho de ELISA MR-96A (Thermo Fisher Scientific, cidade EUA). As concentrações de citocinas (pg/mL) foram determinadas por comparação com uma curva padrão.

Análise estatística

As variáveis foram analisadas quanto à normalidade e homocedasticidade. Os dados paramétricos foram avaliados por ANOVA e a comparação das médias feitas pelos testes T student ou Tukey. Em caso de dados não paramétricos, foram avaliados por teste Mann-Whitney ou Kruskal-Wallis. Todas as análises estatísticas foram realizadas no software Graphpad Prism (GraphPad Software, Boston, EUA).

3.3 RESULTADOS

Animais $\beta 2AR^{-/-}$ ou sob efeito de antagonistas- βAR tem menor recuperação bacteriana

No experimento com camundongos *knockout*, os animais $\beta 2AR^{-/-}$ exibiram menor recuperação de CFU de *L. monocytogenes* no baço e no fígado em comparação aos animais WT (Fig. 3A e B). No experimento de bloqueio farmacológico, os animais que receberam antagonistas dos βAR s exibiram menor recuperação bacteriana no baço, sendo essa redução mais intensa no grupo In-Nad, que teve bloqueio tanto dos $\beta 2$ - como dos $\beta 1AR$ s (Fig. 3C). Não foi observada diferença estatística na recuperação do fígado desse experimento (Fig. 3D). Esses resultados demonstram que a ausência dos $\beta 2AR$ e o bloqueio farmacológico desses receptores é capaz de reduzir a proliferação *in vivo* de *L. monocytogenes*.

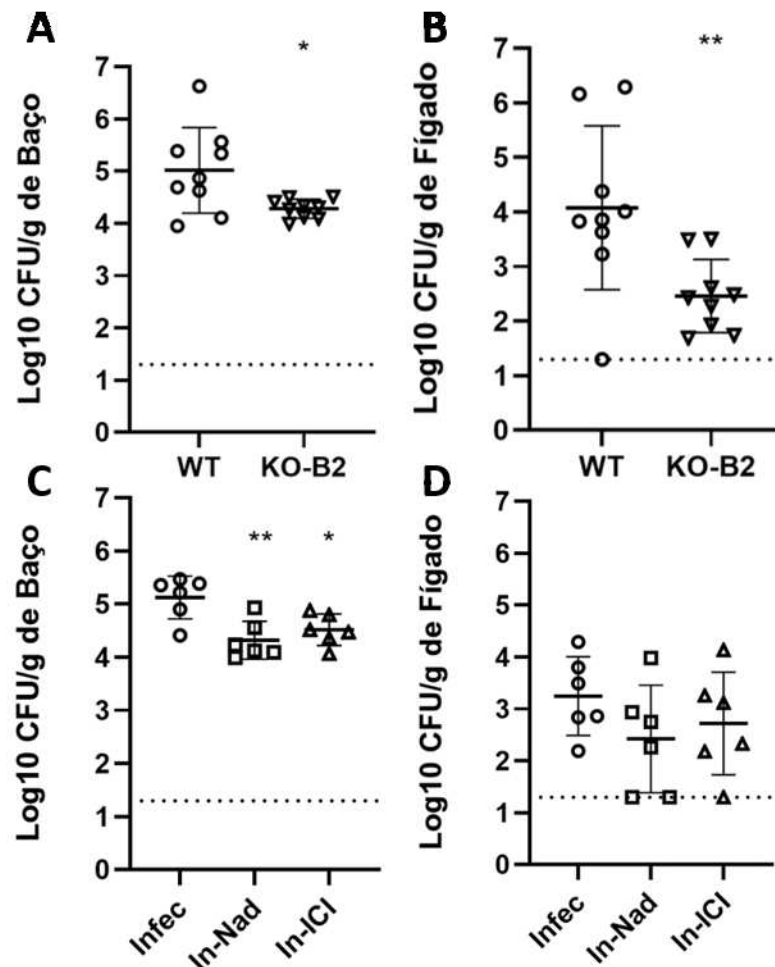


Figura 3. Recuperação bacteriana no baço e fígado de camundongos C57/BL6 infectados por *Listeria monocytogenes*. No primeiro experimento, foram utilizados animais WT e $\beta 2AR^{-/-}$ (n=9) (A e B). No segundo experimento, foram utilizados animais WT com administração intraperitoneal de PBS, nadolol ou ICI 118,551

duas vezes ao dia (n=6) (C e D). Em ambos experimentos, baço e fígado foram coletados no terceiro dia após infecção intraperitoneal com 1×10^5 CFU de *L. monocytogenes*/camundongo. Cada ponto representa um animal e as barras indicam médias e desvio padrão. A linha pontilhada representa o limite de detecção do teste ($1,3 \log_{10}$). Os dados foram transformados em logarítmicos, submetidos aos testes t-Student (A e B) ou one-way ANOVA e as médias comparadas pelo teste de Tukey (C e D), sendo utilizado o grupo Infectado como controle (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$).

Os antagonistas- β ARs não influenciam na esplenomegalia e na perda de peso de animais infectados

Para avaliar as alterações clínicas causadas pela listeriose nos camundongos ou o uso de bloqueadores β ARs, foram escolhidos como parâmetros o peso do baço e a variação do peso corporal. Como esperado na infecção por *L. monocytogenes*, os animais infectados apresentaram o baço mais pesado do que seus respectivos controles. Entretanto, não houve diferença entre os grupos infectados, demonstrando que, mesmo com menor carga bacteriana, não houve influência do tratamento com nadolol ou ICI 118,551 sobre a esplenomegalia (Fig. 4A). Padrão semelhante foi observado quanto à variação do peso total dos animais, que perderam massa corporal ao longo dos 3 dias de infecção em comparação a seus controles (exceto grupos C-ICI e In-ICI), mas não apresentaram diferença entre os grupos infectados (Fig. 4B). Esses resultados indicam que o uso de antagonistas dos β ARs não interfere na manifestação clínica da infecção.

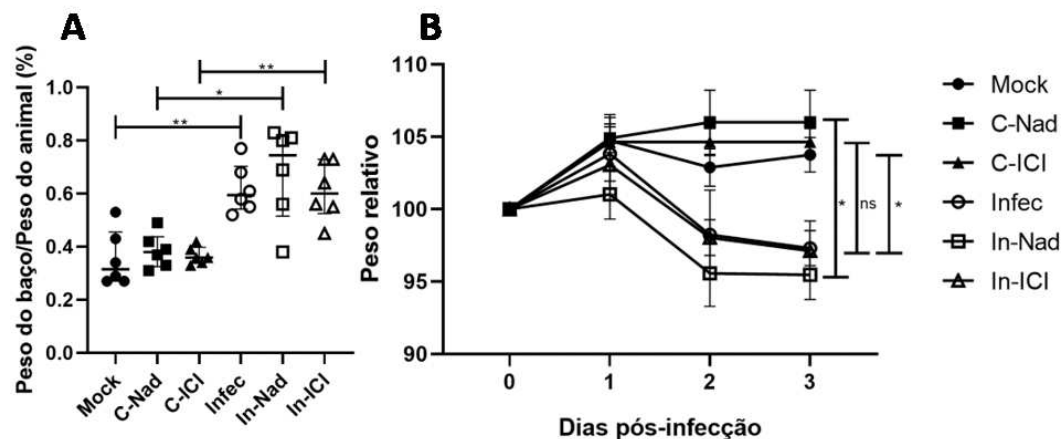


Figura 4. Avaliação de esplenomegalia e variação do peso relativo em camundongos infectados por *L. monocytogenes*. (A) Mensuração relativa do peso do baço pelo peso dos animais. Cada ponto representa um animal, e os traços representam a mediana com intervalo interquartil. Os dados foram submetidos ao teste de Kruskal-Wallis e as medianas comparadas pelo teste de Dunn (n=6). (B) Variação do peso relativo dos animais ao longo dos 3 dias de infecção. O peso de cada animal no dpi 0 foi considerado como 100%. Cada ponto representa a média do grupo e os traços representam o erro padrão. Os dados foram submetidos ao teste 2-way ANOVA e a variação das médias comparadas pelo teste de Tukey (n=6) (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$).

A ausência de sinalização $\beta 2AR$ aumentou a produção de IFN- γ , mas não alterou o perfil de IL-10

Em ambos experimentos, os níveis séricos de IFN- γ , aumentaram significativamente nos animais $\beta 2AR^{-/-}$ e nos WT tratados com nadolol e ICI 118,551 em comparação aos animais controles (Fig. 5A e C). Entretanto, o perfil sorológico de IL-10, não houve redução estatisticamente significativa (Fig. 5B e D). Esses dados demonstram que a ausência ou bloqueio dos $\beta 2AR$ s é suficiente para aumentar os níveis séricos de IFN- γ , citocina pró-inflamatória, mas não foi suficiente para alterar o perfil de IL-10, citocina anti-inflamatória, pelo menos neste modelo experimental.

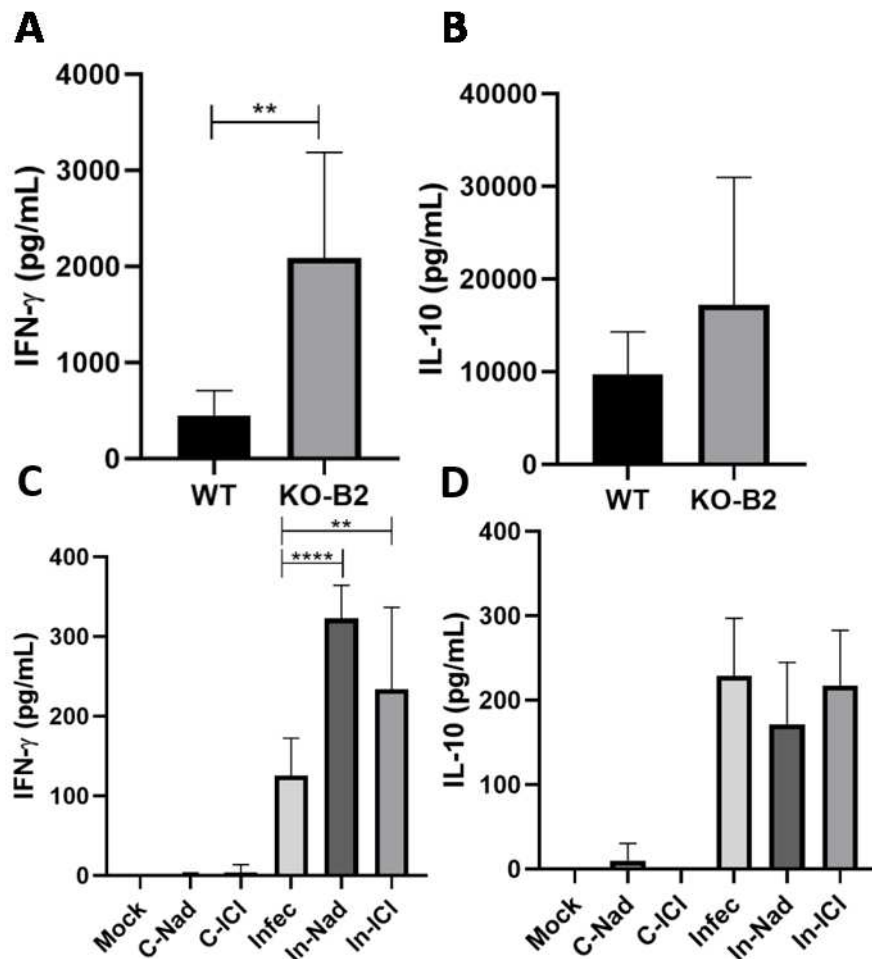


Figura 5. Perfil sorológico de IFN- γ e IL-10 em camundongos C57/BL6 infectados por *L. monocytogenes*, em dois experimentos. No primeiro experimento, foram utilizados animais WT e $\beta 2AR^{-/-}$ (n=9) (A e B). No segundo experimento, foram utilizados animais WT com administração intraperitoneal de PBS, nadolol ou ICI 118,551 duas vezes ao dia (n=6) (C e D). No 3º dia pós-infecção, os animais foram eutanasiados através de sangria por punção cardíaca para coleta de soro. O soro foi submetido à técnica de ELISA em placas de 96 micropoços para mensuração do nível sérico destas citocinas. A leitura foi realizada no comprimento de onda de 490 nm e as concentrações de citocinas (pg/mL) foram determinadas por comparação com uma curva padrão. As barras representam a média com desvio padrão. Os dados foram submetidos aos testes t-Student (A e B) ou one-way ANOVA e as médias comparadas pelo teste de Tukey (C e D) (*p < 0,05; **p < 0,01, ****p < 0,0001).

Animais $\beta 2AR^{-/-}$ apresentam menor escore de lesões histopatológicas, padrão que não é observado no modelo farmacológico

No experimento farmacológico, como havia dúvida se as drogas seriam capazes de gerar lesões nos órgãos, verificamos essa hipótese nos grupos não-infectados. No fígado de alguns animais foi observado degeneração hepatocelular moderada (Fig. 6A), por vezes associada a raras áreas de necrose, entretanto não houve diferença estatística entre os grupos controles (Fig. 7D). Nos animais infectados, foram observadas lesões histopatológicas como microabscessos, áreas multifocais de necrose e raros trombos, que são compatíveis com o quadro de listeriose, inclusive com visualização do agente intralesional por imuno-histoquímica (Fig. 6B a F). Os animais $\beta 2AR^{-/-}$ apresentaram, em fígado e baço, menor escore de lesões histopatológicas quando comparados aos seus controles WT (Fig. 7A e B). Nos grupos Infec, In-Nad e In-ICI não foi observada diferença no escore das lesões (Fig. 7C e D). Este resultado indica que os antagonistas- βAR s não reduziram o grau de lesão tecidual, mesmo favorecendo menor recuperação bacteriana.

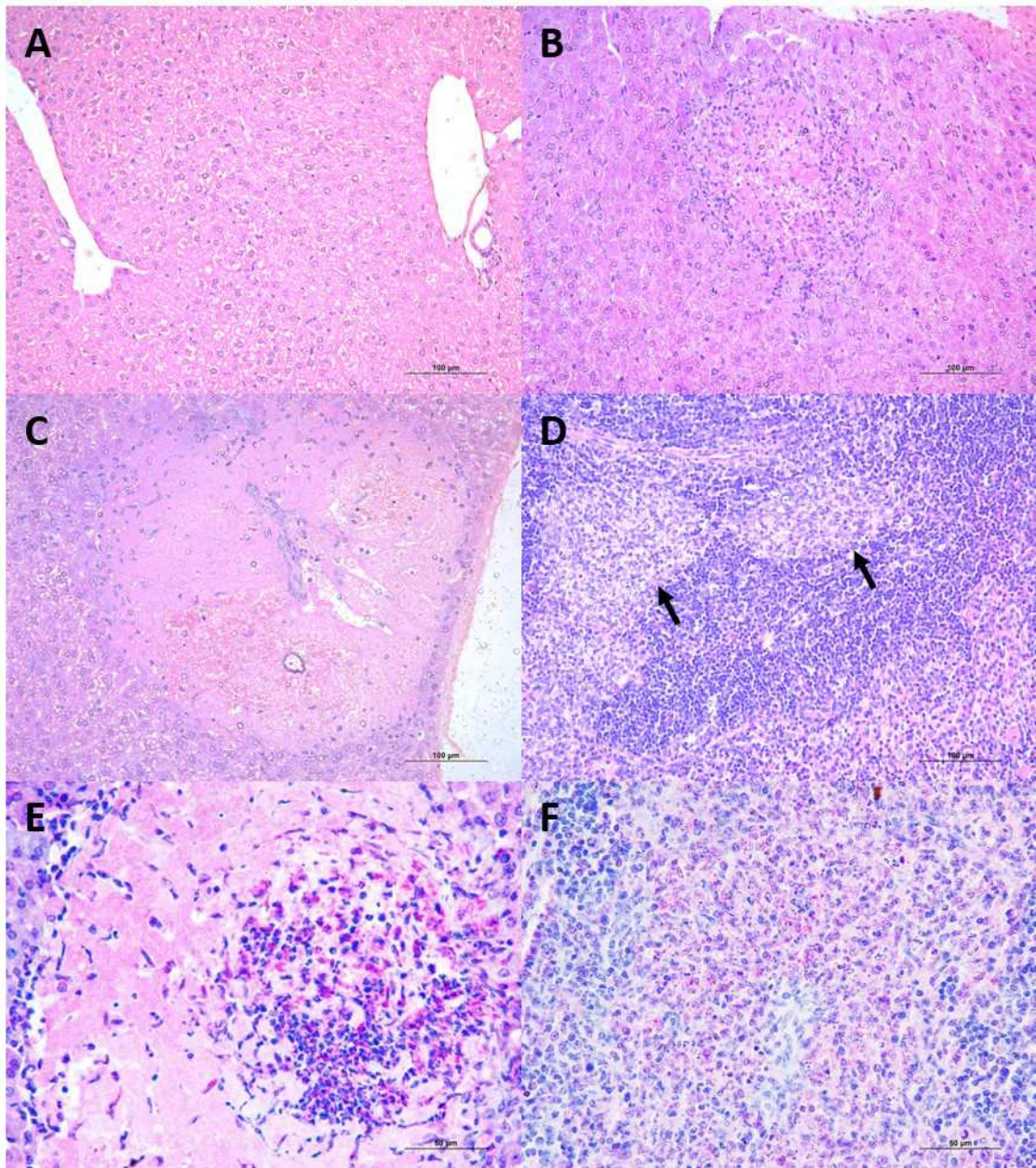


Figura 6. Fotomicroscopias representativas das lesões observadas em baço e fígado de camundongos infectados por *Listeria monocytogenes* e com uso de antagonistas β -adrenérgicos. (A) Fígado de animais não-infectados e com uso de antagonistas β -adrenérgicos (nadolol ou ICI 118,551) exibiram degeneração hepatocelular discreta a moderada. HE, 200X. (B) e (C) Fígado de animais infectados por *L. monocytogenes*, apresentando infiltrado inflamatório neutrofílico e histiocitária em arranjo nodular (microabscessos), com vezes com extensa área de necrose liquefativa central. HE, 200X. (D). Baço de animais infectados por *L. monocytogenes*, apresentando microabscessos (setas). HE, 200X. (E) e (F) Imuno-histoquímica com anticorpo anti-*Listeria* em fígado e baço, respectivamente, de camundongos infectados por *L. monocytogenes*, demonstrando a presença do agente intralésional, corados em cromógeno Magenta, 400X.

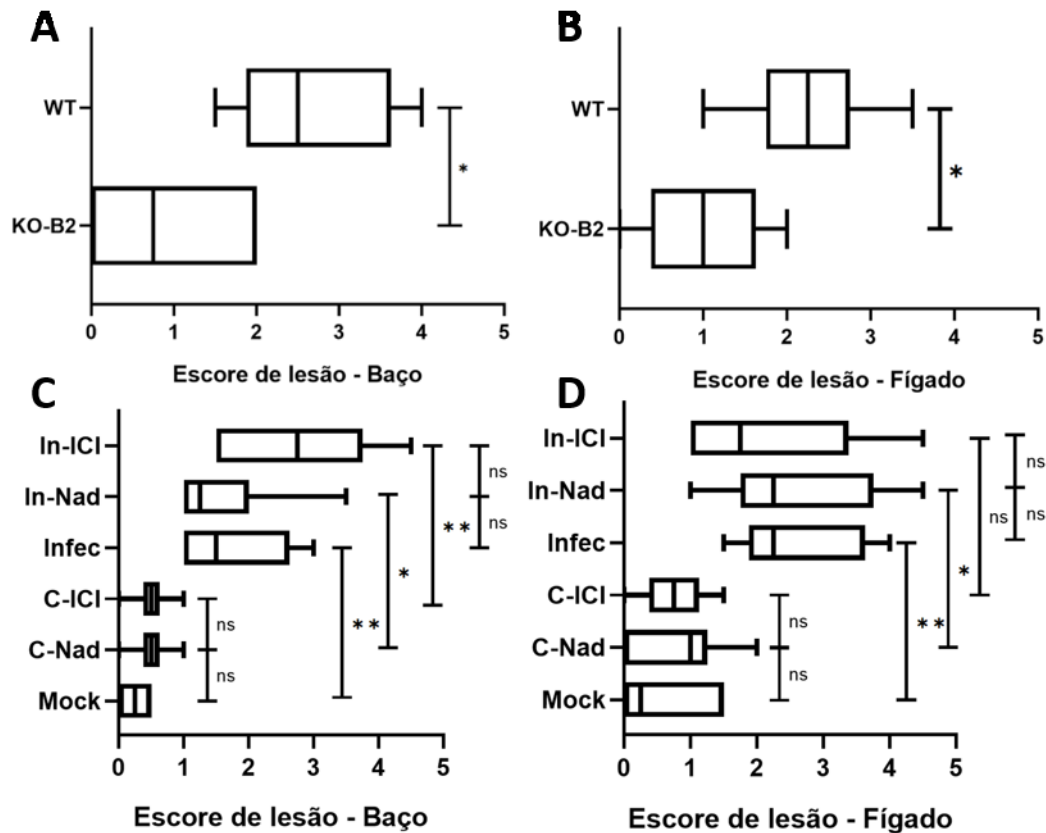


Figura 7. Escore de lesões histopatológicas em baço e fígado de camundongos infectados por *L. monocytogenes*. (A) Fotomicroscopia representativa do fígado de camundongo infectado, demonstrando microabcesso (à esquerda) e extensiva área de necrose (à direita) (HE, 200x). (B) Marcação imuno-histoquímica de *L. monocytogenes* (bastonetes em magenta) em fígado de animal infectado, demonstrando o agente intralésional (cromógeno Magenta, 400x). (C e D) Escore histopatológico de baço e fígado do experimento 1, com animais $\beta 2AR^{-/-}$ e WT (n=6). (E-H) Escore histopatológico de baço e fígado do experimento 2, com animais WT com aplicação de PBS, nadolol ou ICI 118,551 (n=6). Cada ponto representa um animal e as caixas representam a mediana e os valores mínimos e máximos em quartis. Os dados foram submetidos aos testes de Mann-Whitney (C e D) ou Kruskal-Wallis e as medianas comparadas pelo teste de Dunn (E-H) (*p < 0,05).

3.3 DISCUSSÃO

Este estudo fornece um melhor entendimento da ação dos receptores beta-adrenérgicos na resposta imune à infecção por *Listeria monocytogenes*, ao mostrar que o bloqueio desses receptores reduz a recuperação bacteriana ao mesmo tempo que promove um perfil de citocinas pró-inflamatório protetor contra a infecção no modelo murino.

Observamos que a ausência ou bloqueio dos βARs , mais especificamente do $\beta 2$, reduziu significativamente a recuperação de *L. monocytogenes* em baço e fígado. Essa observação demonstra o efeito imunossupressor destes receptores, intimamente correlacionados ao estresse, e como a ausência de estímulo dos mesmos melhora o controle da proliferação bacteriana. Camundongos infectados por *L. monocytogenes* e submetidos à condição de estresse agudo

(contenção no frio por 1h) apresentam maior recuperação bacteriana, que é revertida em animais submetidos à simpactetomia com 6-hidroxidopamina (Cao *et al.*, 2002). O bloqueio farmacológico com outro antagonista- β AR não específico (propranolol) também reduz a recuperação bacteriana em camundongos infectados submetidos a contenção ao frio (Cao *et al.*, 2003). Esse padrão de resposta à listeriose em estresse ao frio também foi observado por Miura *et al.* (2001). Ademais, Emeny *et al.* (2007) estudaram também o efeito deste modelo estresse sob a recuperação, que foi menor em camundongos mutantes β 1AR^{-/-} e β 2AR^{-/-}. Rice *et al.* (2001), em modelo murino sem estímulo estressante, também observou a redução na recuperação de *L. monocytogenes* em animais submetidos à simpatectomia, sendo esse fato atribuído à menor secreção de IL-10 e maior de TNF- α .

Camundongos infectados por *L. monocytogenes* apresentaram esplenomegalia e perda de peso em comparação aos não-infectados, sinais clínicos evidentes no modelo murino de listeriose (Alam *et al.*, 2016). O peso corporal e peso do baço dos animais não sofreram alterações após o bloqueio de β ARs, assim como observado por Emeny *et al.* (2007), indicando que o uso das drogas não altera no ganho de peso dos camundongos, um indicador importante de bem-estar nesta espécie.

IFN- γ é uma citocina fundamental para a eliminação de *L. monocytogenes* do organismo, sendo secretada na fase aguda da infecção por células NK e linfócitos T CD3 (Thäle e Kiderlen, 2005). Os experimentos deste estudo demonstram que a ausência de sinalização dos β ARs aumenta a concentração sérica de IFN- γ , o que pode justificar a menor recuperação bacteriana observada. Resultados semelhantes foram descritos por outros pesquisadores (Miura *et al.*, 2001; Cao *et al.*, 2002; Cao *et al.*, 2003). Cao *et al.* (2002; 2003) também verificaram que os níveis de outras citocinas pró-inflamatórias exibiram o mesmo perfil, como TNF- α , IL-6 e IL-1 β . Em nosso estudo, se esperava uma redução dos níveis de IL-10 nos animais mutantes e sob uso de antagonistas, uma vez que a ativação dos β ARs é conhecida por estimular a secreção dessa citocina anti-inflamatória (Elenkov *et al.*, 2000; Ağaç *et al.*, 2018). Entretanto, tal perfil não foi observado neste estudo. É conhecido que altos níveis de IL-10 interrompem a resposta imune inata frente a *L. monocytogenes* (Kelly e Bancroft, 1996; Dai *et al.*, 1997), entretanto ela continua necessária durante a infecção para a formação de memória em linfócitos CD8⁺ e evitar hiperinflamação no encéfalo (Deckert *et al.*, 2001; Foulds *et al.*, 2006).

Não há estudos prévios correlacionando a ativação ou bloqueio dos β ARs às lesões histopatológicas observada em modelos de listeriose. A hipótese era que após o bloqueio desses receptores, que possuem atividade imunossupressora (Sternberg, 2006; Sanders *et al.*, 2012; Pavlov *et al.*, 2018), houvesse uma melhor resposta imune, melhor controle da infecção e consequentemente, menor escore de lesões no fígado e baço. Essa hipótese foi corroborada no experimento com camundongos $\beta 2AR^{-/-}$, porém o mesmo resultado não foi observado no experimento farmacológico. Esse fato pode ser atribuído à farmacocinética das drogas e ao manejo realizado, que não permitem bloqueio total e duradouro dos β ARs por todo o período experimental.

Em conclusão, observamos que a ausência ou bloqueio dos receptores $\beta 2AR$ em camundongos reduziu a recuperação de *Listeria monocytogenes* do baço e fígado e aumentou a secreção de IFN- γ , mas não reduziu significativamente os sinais clínicos e os níveis séricos de IL-10, e somente os animais mutantes exibiram menor grau de lesões histológicas. Esses achados apontam para a necessidade de investigações futuras que explorem mais a fundo as implicações clínicas e terapêuticas da interação entre a listeriose e os receptores β -adrenérgicos.

4 REFERÊNCIAS

- AĞAÇ, D. *et al.* The $\beta 2$ -adrenergic receptor controls inflammation by driving rapid IL-10 secretion. **Brain, behavior, and immunity**, v. 74, p. 176-185, 2018.
- ALAM, M. S. *et al.* Oral exposure to *Listeria monocytogenes* in aged IL-17RKO mice: A possible murine model to study listeriosis in susceptible populations. **Microbial pathogenesis**, v. 99, p. 236-246, 2016.
- ANANE, L. H. *et al.* Mobilization of $\gamma\delta$ T lymphocytes in response to psychological stress, exercise, and β -agonist infusion. **Brain, behavior, and immunity**, v. 23, n. 6, p. 823-829, 2009.
- ANTAL, E. *et al.* Evidence for intraaxonal spread of *Listeria monocytogenes* from the periphery to the central nervous system. **Brain Pathology**, v. 11, n. 4, p. 432-438, 2001.
- ARAUJO, L. P. *et al.* The sympathetic nervous system mitigates CNS autoimmunity via $\beta 2$ -adrenergic receptor signaling in immune cells. **Cell reports**, v. 28, n. 12, p. 3120-3130. e5, 2019.
- BACOU, E. *et al.* $\beta 2$ -adrenoreceptor stimulation dampens the LPS-induced M1 polarization in pig macrophages. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 76, p. 169-176, 2017.
- BAKARDJIEV, A. I.; THERIOT, J. A.; PORTNOY, D. A. *Listeria monocytogenes* traffics from maternal organs to the placenta and back. **PLoS pathogens**, v. 2, n. 6, p. e66, 2006.
- BAKER, F. L. *et al.* Systemic β -adrenergic receptor activation augments the ex vivo expansion and anti-tumor activity of V γ 9V δ 2 T-cells. **Frontiers in immunology**, p. 3082, 2020.

- BARBUDDHE, S. B. *et al.* Epidemiology and risk management of listeriosis in India. **International journal of food microbiology**, v. 154, n. 3, p. 113-118, 2012.
- BARRIOS-PAYÁN, J. *et al.* The contribution of the sympathetic nervous system to the immunopathology of experimental pulmonary tuberculosis. **Journal of Neuroimmunology**, v. 298, p. 98-105, 2016.
- BERGMANN, S. *et al.* Influence of internalin a murinisation on host resistance to orally acquired listeriosis in mice. **BMC microbiology**, v. 13, n. 1, p. 1-16, 2013.
- BHUNIA, A. K. **Foodborne microbial pathogens: mechanisms and pathogenesis**. Springer, 2018.
- BIGLEY, A. B. *et al.* Acute exercise preferentially redeploys NK-cells with a highly-differentiated phenotype and augments cytotoxicity against lymphoma and multiple myeloma target cells. Part II: impact of latent cytomegalovirus infection and catecholamine sensitivity. **Brain, behavior, and immunity**, v. 49, p. 59-65, 2015.
- BLANOT, S. *et al.* A gerbil model for rhombencephalitis due to *Listeria monocytogenes*. **Microbial pathogenesis**, v. 23, n. 1, p. 39-48, 1997.
- BONNEAU, R. H.; KIECOLT-GLASER, J. K.; GLASER, R. Stress-induced modulation of the immune response. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 594, n. 1, p. 253-269, 1990.
- BRUGÈRE-PICOUX, J. Ovine listeriosis. **Small Ruminant Research**, v. 76, n. 1-2, p. 12-20, 2008.
- BUBERT, A. *et al.* Differential expression of *Listeria monocytogenes* virulence genes in mammalian host cells. **Molecular and General Genetics MGG**, v. 261, p. 323-336, 1999.
- BUCHANAN, R. L. *et al.* A review of *Listeria monocytogenes*: An update on outbreaks, virulence, dose-response, ecology, and risk assessments. **Food control**, v. 75, p. 1-13, 2017.
- BUCHRIESER, C. *et al.* Complete genome sequence of the animal pathogen *Listeria ivanovii*, which provides insights into host specificities and evolution of the genus *Listeria*. 2011.
- CAO, L.; FILIPOV, N. M.; LAWRENCE, D. A. Sympathetic nervous system plays a major role in acute cold/restraint stress inhibition of host resistance to *Listeria monocytogenes*. **Journal of neuroimmunology**, v. 125, n. 1-2, p. 94-102, 2002.
- CAO, L.; HUDSON, C. A.; LAWRENCE, D. A. Acute cold/restraint stress inhibits host resistance to *Listeria monocytogenes* via β 1-adrenergic receptors. **Brain, behavior, and immunity**, v. 17, n. 2, p. 121-133, 2003.
- CDC (Center for Disease Control and Prevention). **Listeria Outbreaks**, 2023. Disponível em < <https://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/index.html> >. Acesso em: 11/12/2023.
- CHARLIER, C. *et al.* Clinical features and prognostic factors of listeriosis: the MONALISA national prospective cohort study. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 17, n. 5, p. 510-519, 2017.
- CHHATAR, S.; LAL, G. Role of adrenergic receptor signalling in neuroimmune communication. **Current Research in Immunology**, v. 2, p. 202-217, 2021.
- CLARK, R. G.; GILL, J. M.; SWANNEY, S. *Listeria monocytogenes* gastroenteritis in sheep. **New Zealand veterinary journal**, v. 52, n. 1, p. 46-47, 2004.
- COUSENS, L. P.; WING, E. J. Innate defenses in the liver during *Listeria* infection. **Immunological reviews**, v. 174, p. 150-159, 2000.
- DAI, W. J.; KÖHLER, G.; BROMBACHER, F. Both innate and acquired immunity to *Listeria monocytogenes* infection are increased in IL-10-deficient mice. **Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, v. 158, n. 5, p. 2259-2267, 1997.

- DECKERT, M. *et al.* Endogenous interleukin-10 is required for prevention of a hyperinflammatory intracerebral immune response in *Listeria monocytogenes* meningoencephalitis. **Infection and immunity**, v. 69, n. 7, p. 4561-4571, 2001.
- DENNEY, D. R.; STEPHENSON, L. A.; PENICK, E. C.; WELLER, R. A. Lymphocyte subclasses and depression. **Journal of Abnormal Psychology**, v. 97, n. 4, p. 499, 1988.
- DEO, S. H. *et al.* Norepinephrine increases NADPH oxidase-derived superoxide in human peripheral blood mononuclear cells via α -adrenergic receptors. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 305, n. 10, p. R1124-R1132, 2013.
- DEVI, S. *et al.* Adrenergic regulation of the vasculature impairs leukocyte interstitial migration and suppresses immune responses. **Immunity**, v. 54, n. 6, p. 1219-1230. e7, 2021.
- DHABHAR, F. S. Enhancing versus suppressive effects of stress on immune function: implications for immunoprotection and immunopathology. **Neuroimmunomodulation**, v. 16, n. 5, p. 300-317, 2009.
- DHABHAR, F. S. *et al.* Effects of stress on immune cell distribution. Dynamics and hormonal mechanisms. **The Journal of Immunology**, v. 154, n. 10, p. 5511-5527, 1995.
- DHABHAR, F. S.; MCEWEN, B. S. Stress-induced enhancement of antigen-specific cell-mediated immunity. **The Journal of Immunology**, v. 156, n. 7, p. 2608-2615, 1996.
- DHAMA, K. *et al.* *Listeria monocytogenes* infection in poultry and its public health importance with special reference to food borne zoonoses. **Pakistan journal of biological sciences: PJBS**, v. 16, n. 7, p. 301-308, 2013.
- DHAMA, K. *et al.* Listeriosis in animals, its public health significance (food-borne zoonosis) and advances in diagnosis and control: a comprehensive review. **Veterinary Quarterly**, v. 35, n. 4, p. 211-235, 2015.
- DIAZ-SALAZAR, C. *et al.* Cell-intrinsic adrenergic signaling controls the adaptive NK cell response to viral infection. **Journal of Experimental Medicine**, v. 217, n. 4, 2020.
- DISSON, O. *et al.* Conjugated action of two species-specific invasion proteins for fetoplacental listeriosis. **Nature**, v. 455, n. 7216, p. 1114-1118, 2008.
- DISSON, Olivier; LECUIT, Marc. Targeting of the central nervous system by *Listeria monocytogenes*. **Virulence**, v. 3, n. 2, p. 213-221, 2012.
- DRAMSI, S. *et al.* Entry of *Listeria monocytogenes* into hepatocytes requires expression of inIB, a surface protein of the internalin multigene family. **Molecular microbiology**, v. 16, n. 2, p. 251-261, 1995.
- ELENKOV, Ilia J. *et al.* The sympathetic nerve—an integrative interface between two supersystems: the brain and the immune system. **Pharmacological reviews**, v. 52, n. 4, p. 595-638, 2000.
- EMENY, R. T.; GAO, D.; LAWRENCE, D. A. β 1-adrenergic receptors on immune cells impair innate defenses against *Listeria*. **The Journal of Immunology**, v. 178, n. 8, p. 4876-4884, 2007.
- ENGELLEN-LEE, J. Y. *et al.* Histopathology of *Listeria* meningitis. **Journal of Neuropathology & Experimental Neurology**, v. 77, n. 10, p. 950-957, 2018.
- FAO e WHO (Food and Agriculture Organisation/World Health Organisation). **Risk assessment of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods: interpretative summary**, 2004.
- FOULDS, K. E.; ROTTE, M. J.; SEDER, R. A. IL-10 is required for optimal CD8 T cell memory following *Listeria monocytogenes* infection. **The Journal of Immunology**, v. 177, n. 4, p. 2565-2574, 2006.
- FRANDE-CABANES, E. *et al.* Dissociation of innate immune responses in microglia infected with *Listeria monocytogenes*. **Glia**, v. 62, n. 2, p. 233-246, 2014.

- GAILLARD, J.-L. *et al.* Entry of *L. monocytogenes* into cells is mediated by internalin, a repeat protein reminiscent of surface antigens from gram-positive cocci. **Cell**, v. 65, n. 7, p. 1127-1141, 1991.
- GAN, X.; ZHANG, L.; SOLOMON, G. F.; BONAVIDA, B. Mechanism of norepinephrine-mediated inhibition of human NK cytotoxic functions: inhibition of cytokine secretion, target binding, and programming for cytotoxicity. **Brain, behavior, and immunity**, v. 16, n. 3, p. 227-246, 2002.
- GARCÍA, J. J.; DEL CARMEN SÁEZ, M.; DE LA FUENTE, M.; ORTEGA, E. Regulation of phagocytic process of macrophages by noradrenaline and its end metabolite 4-hydroxy-3-metoxyphenyl-glycol. Role of α - and β -adrenoreceptors. **Molecular and cellular biochemistry**, v. 254, n. 1, p. 299-304, 2003.
- GIORDANI, L. *et al.* β 2-Agonist clenbuterol hinders human monocyte differentiation into dendritic cells. **Experimental Cell Research**, v. 339, n. 2, p. 163-173, 2015.
- GLOMSKI, I. J. *et al.* The *Listeria monocytogenes* hemolysin has an acidic pH optimum to compartmentalize activity and prevent damage to infected host cells. **The Journal of cell biology**, v. 156, n. 6, p. 1029-1038, 2002.
- GRAFF, R. M. *et al.* β 2-Adrenergic receptor signaling mediates the preferential mobilization of differentiated subsets of CD8⁺ T-cells, NK-cells and non-classical monocytes in response to acute exercise in humans. **Brain, behavior, and immunity**, v. 74, p. 143-153, 2018.
- GRAILER, J. J. *et al.* Induction of M2 regulatory macrophages through the β 2-adrenergic receptor with protection during endotoxemia and acute lung injury. **Journal of innate immunity**, v. 6, n. 5, p. 607-618, 2014.
- GRAY, M. L.; KILLINGER, A. H. *Listeria monocytogenes* and listeric infections. **Bacteriological reviews**, v. 30, n. 2, p. 309-382, 1966.
- GREBE, K. M. *et al.* Cutting edge: Sympathetic nervous system increases proinflammatory cytokines and exacerbates influenza A virus pathogenesis. **The Journal of Immunology**, v. 184, n. 2, p. 540-544, 2010.
- GREBE, K. M. *et al.* Sympathetic nervous system control of anti-influenza CD8⁺ T cell responses. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 13, p. 5300-5305, 2009.
- GRISANTI, Laurel A. *et al.* α 1-adrenergic receptors positively regulate Toll-like receptor cytokine production from human monocytes and macrophages. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 338, n. 2, p. 648-657, 2011.
- HOELZER, K.; POUILLOT, R.; DENNIS, S.. Animal models of listeriosis: a comparative review of the current state of the art and lessons learned. **Veterinary research**, v. 43, n. 1, p. 1-27, 2012.
- IGNATOWSKI, T. A.; GALLANT, S.; SPENGLER, R. N. Temporal regulation by adrenergic receptor stimulation of macrophage (M ϕ)-derived tumor necrosis factor (TNF) production post-LPS challenge. **Journal of neuroimmunology**, v. 65, n. 2, p. 107-117, 1996.
- IRONSON, G. *et al.* Psychosocial and neurohormonal predictors of HIV disease progression (CD4 cells and viral load): a 4 year prospective study. **AIDS and Behavior**, v. 19, n. 8, p. 1388-1397, 2015.
- JETSCHMANN, J. *et al.* Expression and in-vivo modulation of α - and β -adrenoceptors on human natural killer (CD16⁺) cells. **Journal of neuroimmunology**, v. 74, n. 1-2, p. 159-164, 1997.
- JUNTILA, J. R.; NIEMELÄ, S. I.; HIRN, J.. Minimum growth temperatures of *Listeria monocytogenes* and non-haemolytic *Listeria*. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 65, n. 4, p. 321-327, 1988.

- KELLY, J. P.; BANCROFT, G. J. Administration of interleukin-10 abolishes innate resistance to *Listeria monocytogenes*. **European journal of immunology**, v. 26, n. 2, p. 356-364, 1996.
- KENNEDY, S. *et al.* Risk factors associated with outcome in goats with encephalitic listeriosis: A retrospective study of 36 cases from 2008 to 2021. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, 2023.
- KHELEF, N. *et al.* Species specificity of the *Listeria monocytogenes* InlB protein. **Cellular microbiology**, v. 8, n. 3, p. 457-470, 2006.
- KIECOLT-GLASER, J. K. *et al.* Marital discord and immunity in males. **Psychosomatic Medicine**, v. 50, n. 3, p. 213-229, 1988.
- KIM, K. S. Mechanisms of microbial traversal of the blood–brain barrier. **Nature Reviews Microbiology**, v. 6, n. 8, p. 625-634, 2008.
- KIM, M. *et al.* Catecholamine stress alters neutrophil trafficking and impairs wound healing by β 2-adrenergic receptor–mediated upregulation of IL-6. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 134, n. 3, p. 809-817, 2014.
- KOBAYASHI, M. *et al.* Propranolol as a modulator of M2b monocytes in severely burned patients. **Journal of leukocyte biology**, v. 89, n. 5, p. 797-803, 2011.
- KOCKS, C. *et al.* *L. monocytogenes*-induced actin assembly requires the actA gene product, a surface protein. **Cell**, v. 68, n. 3, p. 521-531, 1992.
- KOHN, A. P.; SANDERS, V. M. Norepinephrine and β 2-adrenergic receptor stimulation regulate CD4⁺ T and B lymphocyte function in vitro and in vivo. **Pharmacological reviews**, v. 53, n. 4, p. 487-525, 2001.
- KOHN, A. P.; SANDERS, V. M. Suppression of antigen-specific Th2 cell-dependent IgM and IgG1 production following norepinephrine depletion in vivo. **The Journal of Immunology**, v. 162, n. 9, p. 5299-5308, 1999.
- KOOPMAN, F. A.; VAN MAANEN, M. A.; VERVOORDELDONK, M. J.; TAK, P. P. Balancing the autonomic nervous system to reduce inflammation in rheumatoid arthritis. **Journal of internal medicine**, v. 282, n. 1, p. 64-75, 2017.
- KOOPMANS, M. M. *et al.* Human listeriosis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 36, n. 1, p. e00060-19, 2023.
- KOOPMANS, M. M. *et al.* *Listeria monocytogenes* sequence type 6 and increased rate of unfavorable outcome in meningitis: epidemiologic cohort study. **Clinical Infectious Diseases**, v. 57, n. 2, p. 247-253, 2013.
- LANDMANN, R. Beta-adrenergic receptors in human leukocyte subpopulations. **European journal of clinical investigation**, v. 22, p. 30-36, 1992.
- LECUIT, M. *et al.* A single amino acid in E-cadherin responsible for host specificity towards the human pathogen *Listeria monocytogenes*. **The EMBO journal**, v. 18, n. 14, p. 3956-3963, 1999.
- LECUIT, M. Human listeriosis and animal models. **Microbes and infection**, v. 9, n. 10, p. 1216-1225, 2007.
- LECUIT, M. *Listeria monocytogenes*, a model in infection biology. **Cellular microbiology**, v. 22, n. 4, p. e13186, 2020.
- LEVRAUD, J. *et al.* Real-time observation of *Listeria monocytogenes*-phagocyte interactions in living zebrafish larvae. **Infection and immunity**, v. 77, n. 9, p. 3651-3660, 2009.
- LI, Y.; LI, H.; ZHANG, D. Timing of norepinephrine initiation in patients with septic shock: a systematic review and meta-analysis. **Critical Care**, v. 24, n. 1, p. 1-9, 2020.
- LUBAHN, C. L. *et al.* Targeting α - and β -adrenergic receptors differentially shifts Th1, Th2, and inflammatory cytokine profiles in immune organs to attenuate adjuvant arthritis. **Frontiers in immunology**, v. 5, p. 346, 2014.

- MACKANESS, GB2137547. Cellular resistance to infection. **The Journal of experimental medicine**, v. 116, n. 3, p. 381-406, 1962.
- MADARAME, H. *et al.* The distribution of E-cadherin expression in listeric rhombencephalitis of ruminants indicates its involvement in *Listeria monocytogenes* neuroinvasion. **Neuropathology and applied neurobiology**, v. 37, n. 7, p. 753-767, 2011.
- MAESTRONI, G. J. M. Modulation of skin norepinephrine turnover by allergen sensitization: impact on contact hypersensitivity and T helper priming. **Journal of investigative dermatology**, v. 122, n. 1, p. 119-124, 2004.
- MARINO, F. *et al.* β 2-Adrenoceptors inhibit neutrophil extracellular traps in human polymorphonuclear leukocytes. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 104, n. 3, p. 603-614, 2018.
- MCLAUCHLIN, J. *et al.* *Listeria monocytogenes* and listeriosis: a review of hazard characterisation for use in microbiological risk assessment of foods. **International journal of food microbiology**, v. 92, n. 1, p. 15-33, 2004.
- MEEHL, M. A.; CAPARON, M. G. Specificity of streptolysin O in cytolysin-mediated translocation. **Molecular microbiology**, v. 52, n. 6, p. 1665-1676, 2004.
- MELTZER, J. C. *et al.* Contribution of the adrenal glands and splenic nerve to LPS-induced splenic cytokine production in the rat. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 17, n. 6, p. 482-497, 2003.
- MENGAUD, Jérôme *et al.* E-cadherin is the receptor for internalin, a surface protein required for entry of *L. monocytogenes* into epithelial cells. **Cell**, v. 84, n. 6, p. 923-932, 1996.
- MIURA, T. *et al.* Effect of 6-hydroxydopamine on host resistance against *Listeria monocytogenes* infection. **Infection and immunity**, v. 69, n. 12, p. 7234-7241, 2001.
- MONK, I. R. *et al.* Directed evolution and targeted mutagenesis to murinize *Listeria monocytogenes* internalin A for enhanced infectivity in the murine oral infection model. **BMC microbiology**, v. 10, p. 1-13, 2010.
- MURRAY, E. G. D.; WEBB, R. A.; SWANN, M. B. R. A disease of rabbits characterised by a large mononuclear leucocytosis, caused by a hitherto undescribed bacillus *Bacterium monocytogenes* (n. sp.). **The Journal of Pathology and Bacteriology**, v. 29, n. 4, p. 407-439, 1926.
- NANCE, D. M.; SANDERS, V. M. Autonomic innervation and regulation of the immune system (1987–2007). **Brain, behavior, and immunity**, v. 21, n. 6, p. 736-745, 2007.
- NORTH, R. J.; DUNN, P. L.; CONLAN, J. W.. Murine listeriosis as a model of antimicrobial defense. **Immunological reviews**, v. 158, n. 1, p. 27-36, 1997.
- OEVERMANN, A. *et al.* Neuropathogenesis of naturally occurring encephalitis caused by *Listeria monocytogenes* in ruminants. **Brain pathology**, v. 20, n. 2, p. 378-390, 2010.
- OIE (World Organisation for Animal Health). *Listeria monocytogenes*. Chapter 3.9.6. Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals, 2018. Disponível em: <https://www.woah.org/fileadmin/Home/fr/Health_standards/tahm/3.09.06_LISTERIA_MONO.pdf> Acesso em: 08/12/2023.
- PADRO, C. J.; SANDERS, V. M. Neuroendocrine regulation of inflammation. In: **Seminars in immunology**. Academic Press, 2014. p. 357-368.
- PANINA-BORDIGNON, P. *et al.* Beta2-agonists prevent Th1 development by selective inhibition of interleukin 12. **The Journal of clinical investigation**, v. 100, n. 6, p. 1513-1519, 1997.
- PAUL, S.; KULKARNI, N.; SHILPI; LAL, G. Intratumoral natural killer cells show reduced effector and cytolytic properties and control the differentiation of effector Th1 cells. **Oncoimmunology**, v. 5, n. 12, p. e1235106, 2016.

- PAUL, S.; LAL, G. The molecular mechanism of natural killer cells function and its importance in cancer immunotherapy. **Frontiers in immunology**, v. 8, p. 1124, 2017.
- PAVLOS, N. J.; FRIEDMAN, P. A. GPCR signaling and trafficking: the long and short of it. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 28, n. 3, p. 213-226, 2017.
- PAVLOV, Valentin A.; CHAVAN, Sangeeta S.; TRACEY, Kevin J. Molecular and functional neuroscience in immunity. **Annual review of immunology**, v. 36, p. 783-812, 2018.
- PIRIE, J. H. H. (1927). A new disease of veld rodents, "Tiger riverdisease.". Publications of the South African Institute for Medical Research, 62, 163–186.
- PODOJIL, J. R.; SANDERS, V. M. CD86 and β 2-adrenergic receptor stimulation regulate B-cell activity cooperatively. **Trends in immunology**, v. 26, n. 4, p. 180-185, 2005.
- PORTNOY, D. A.; JACKS, P. S.; HINRICHS, D. J. Role of hemolysin for the intracellular growth of *Listeria monocytogenes*. **The Journal of experimental medicine**, v. 167, n. 4, p. 1459-1471, 1988.
- POSTON, R. M.; KURLANDER, R. J. Cytokine expression in vivo during murine listeriosis. Infection with live, virulent bacteria is required for monokine and lymphokine messenger RNA accumulation in the spleen. **The Journal of Immunology**, v. 149, n. 9, p. 3040-3044, 1992.
- PRÖSCH, S. *et al.* A novel link between stress and human cytomegalovirus (HCMV) infection: sympathetic hyperactivity stimulates HCMV activation. **Virology**, v. 272, n. 2, p. 357-365, 2000.
- PRUETT, Stephen B. Stress and the immune system. **Pathophysiology**, v. 9, n. 3, p. 133-153, 2003.
- QIAO, G. *et al.* β -Adrenergic signaling blocks murine CD8⁺ T-cell metabolic reprogramming during activation: a mechanism for immunosuppression by adrenergic stress. **Cancer Immunology, Immunotherapy**, v. 68, n. 1, p. 11-22, 2019.
- RICE, P. A. *et al.* Chemical sympathectomy increases the innate immune response and decreases the specific immune response in the spleen to infection with *Listeria monocytogenes*. **Journal of neuroimmunology**, v. 114, n. 1-2, p. 19-27, 2001.
- ROCHA, Cláudia EV *et al.* Alginate-chitosan microcapsules improve vaccine potential of gamma-irradiated *Listeria monocytogenes* against listeriosis in murine model. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 176, p. 567-577, 2021.
- ROCOURT, J. R. *et al.* **Human listeriosis: 1989**. World Health Organization, 1991.
- SANDERS, V. M. The beta2-adrenergic receptor on T and B lymphocytes: do we understand it yet?. **Brain, behavior, and immunity**, v. 26, n. 2, p. 195-200, 2012.
- SCANZANO, A. *et al.* Adrenergic modulation of migration, CD11b and CD18 expression, ROS and interleukin-8 production by human polymorphonuclear leukocytes. **Inflammation Research**, v. 64, n. 2, p. 127-135, 2015.
- SCHLECH III, W. F. *et al.* Epidemic listeriosis—evidence for transmission by food. **New england journal of medicine**, v. 308, n. 4, p. 203-206, 1983.
- SCHLECH III, W. F.; ACHESON, D. Foodborne listeriosis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 31, n. 3, p. 770-775, 2000.
- SCHNUPF, P.; PORTNOY, D. A. Listeriolysin O: a phagosome-specific lysin. **Microbes and infection**, v. 9, n. 10, p. 1176-1187, 2007.
- SEILER, A.; FAGUNDES, C. P.; CHRISTIAN, L. M. The impact of everyday stressors on the immune system and health. In: **Stress challenges and immunity in space**. Springer, Cham, 2020. p. 71-92.

- SHARMA, D.; FARRAR, J. D. Adrenergic regulation of immune cell function and inflammation. In: **Seminars in immunopathology**. Springer Berlin Heidelberg, 2020. p. 709-717.
- SIMPSON, R. J. *et al.* Exercise and adrenergic regulation of immunity. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 97, p. 303-318, 2021.
- SIMPSON, R. J. *et al.* Human cytomegalovirus infection and the immune response to exercise. **Exercise Immunology Review**, v. 22, 2016.
- SMITH, M. A. *et al.* Dose-response model for *Listeria monocytogenes*-induced stillbirths in nonhuman primates. **Infection and immunity**, v. 76, n. 2, p. 726-731, 2008.
- STEFANSKI, V.; BEN-ELIYAHU, S. Social confrontation and tumor metastasis in rats: defeat and β -adrenergic mechanisms. **Physiology & behavior**, v. 60, n. 1, p. 277-282, 1996.
- STEINMAN, L. Elaborate interactions between the immune and nervous systems. **Nature immunology**, v. 5, n. 6, p. 575-581, 2004.
- STERNBERG, Esther M. Neural regulation of innate immunity: a coordinated nonspecific host response to pathogens. **Nature Reviews Immunology**, v. 6, n. 4, p. 318-328, 2006.
- STOLK, R. F. *et al.* Norepinephrine dysregulates the immune response and compromises host defense during sepsis. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 202, n. 6, p. 830-842, 2020.
- STOLK, R. F. *et al.* Potentially inadvertent immunomodulation: norepinephrine use in sepsis. **American journal of respiratory and critical care medicine**, v. 194, n. 5, p. 550-558, 2016.
- STRAIN, G.M. Autonomic nervous system. In: REECE, W.O., Dukes' Physiology of Domestic Animals, 12th ed. Cornell University Press: Ithaca, NY. 2004, Ch 52, pp 921-934.
- STRAWN, L. K. *et al.* Landscape and meteorological factors affecting prevalence of three food-borne pathogens in fruit and vegetable farms. **Applied and environmental microbiology**, v. 79, n. 2, p. 588-600, 2013.
- SWANSON, M. A.; LEE, W. T.; SANDERS, V. M. IFN- γ production by Th1 cells generated from naive CD4+ T cells exposed to norepinephrine. **The Journal of Immunology**, v. 166, n. 1, p. 232-240, 2001.
- TAKAHASHI, A. *et al.* Aggression, social stress, and the immune system in humans and animal models. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, v. 12, p. 56, 2018.
- THÄLE, C.; KIDERLEN, A. F. Sources of interferon-gamma (IFN- γ) in early immune response to *Listeria monocytogenes*. **Immunobiology**, v. 210, n. 9, p. 673-683, 2005.
- THOMAS, J. *et al.* Outbreak of listeriosis in South Africa associated with processed meat. **New England Journal of Medicine**, v. 382, n. 7, p. 632-643, 2020.
- TODD, E. C. D.; NOTERMANS, S. Surveillance of listeriosis and its causative pathogen, *Listeria monocytogenes*. **Food control**, v. 22, n. 9, p. 1484-1490, 2011.
- TOPALOVSKI, M.; YANG, S. S.; BOONPASAT, Y. Listeriosis of the placenta: clinicopathologic study of seven cases. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 169, n. 3, p. 616-620, 1993.
- TRAVIER, L.; LECUIT, M. *Listeria monocytogenes* ActA: a new function for a 'classic' virulence factor. **Current opinion in microbiology**, v. 17, p. 53-60, 2014.
- ULRICH-LAI, Y. M.; HERMAN, J. P. Neural regulation of endocrine and autonomic stress responses. **Nature reviews neuroscience**, v. 10, n. 6, p. 397-409, 2009.
- VAN DER POLL, T. *et al.* Epinephrine inhibits tumor necrosis factor- α and potentiates interleukin 10 production during human endotoxemia. **The Journal of clinical investigation**, v. 97, n. 3, p. 713-719, 1996.
- VÁZQUEZ-BOLAND, J. A. *et al.* Pathogenicity islands and virulence evolution in *Listeria*. **Microbes and infection**, v. 3, n. 7, p. 571-584, 2001.

- WIEDUWILD, E. *et al.* β 2-adrenergic signals downregulate the innate immune response and reduce host resistance to viral infection. **Journal of Experimental Medicine**, v. 217, n. 4, 2020.
- WOLFE, B. *et al.* Acute fetal demise with first trimester maternal infection resulting from *listeria monocytogenes* in a nonhuman primate model. **MBio**, v. 8, n. 1, p. 10.1128/mbio.01938-16, 2017.
- WU, A.; CABRERA-PAZ, F;; FISCHER-STENGER, K. β -Adrenergic Receptor Signaling Reduces Pro-Inflammatory Signaling and Promotes the M2 Phenotype in the RAW264. 7 Macrophage Cell Line. **The FASEB Journal**, v. 36, 2022.
- WU, H. *et al.* β 2-adrenoceptor signaling reduction in dendritic cells is involved in the inflammatory response in adjuvant-induced arthritic rats. **Scientific reports**, v. 6, n. 1, p. 1-11, 2016.
- ZHANG, T. *et al.* Deciphering the landscape of host barriers to *Listeria monocytogenes* infection. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 114, n. 24, p. 6334-6339, 2017.
- ZIEZIULEWICZ, T. J. *et al.* Stress-induced effects, which inhibit host defenses, alter leukocyte trafficking. **Cell Stress and Chaperones**, v. 18, p. 279-291, 2013.