



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

DANIEL HIDEO KAKITANI

**A RESPOSTA IMUNOLÓGICA INATA NA INFECÇÃO
INICIAL POR *Listeria monocytogenes* NÃO É INFLUENCIADA
PELA AUSÊNCIA DE 5-LIPOXIGENASE**

DANIEL HIDEO KAKITANI

**A RESPOSTA IMUNOLÓGICA INATA NA INFECÇÃO
INICIAL POR *Listeria monocytogenes* NÃO É INFLUENCIADA
PELA AUSÊNCIA DE 5-LIPOXIGENASE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito final para obtenção do título de Mestre em Microbiologia.

Orientadora: Prof. Dra. Halha Ostrensky Saridakis.

Londrina
2009

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Kakitani, Daniel Hideo .

A resposta imunológica inata na infecção inicial por *Listeria monocytogenes* não é influenciada pela ausência de 5-lipoxigenase / Daniel Hideo Kakitani. - Londrina, 2009. 45 f. : il.

Orientador: Halha Ostrensky Saradakis.

Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, 2009.

Inclui bibliografia.

1. *Listeria monocytogenes* - Tese. 2. 5-lipoxigenase - Tese. 3. Imunidade Inata - Tese. I. Saradakis, Halha Ostrensky . II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia. III. Título.

DANIEL HIDEO KAKITANI

**A RESPOSTA IMUNOLÓGICA INATA NA INFECÇÃO INICIAL POR
Listeria monocytogenes NÃO É INFLUENCIADA PELA AUSÊNCIA DE 5-
LIPOXIGENASE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito final para obtenção do título de Mestre em Microbiologia.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof^a. Dra. Halha Ostrensky Saridakis
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dra. Ionice Felipe
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Vinicius Daher Alvares Delfino
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 07 de Maio de 2009.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter abençoado minha vida e minha família com amor e saúde.

A minha esposa e filho que tiveram muita paciência, compreensão e amor nas horas difíceis que já passamos. Obrigado, amo muito vocês.

Aos meus pais por todo apoio já dado.

À minha querida orientadora, Prof^a. Dra. Halha Ostrensky Saridakis pela ajuda sem limites dado para a realização deste trabalho e pela virtuosa paciência a este aluno a quem ensinou a prática laboratorial.

Ao Prof. Dr. Phileo Phinge Filho pela ajuda proporcionada.

Aos colegas do estudo Alexandre Saito e Carolina Panis, pois sem a ajuda deles este trabalho não seria realizado.

Aos colegas de laboratório pela grande ajuda e paciência.

KAKITANI, Daniel Hideo. **A resposta imunológica inata na infecção inicial por *Listeria monocytogenes* não é influenciada pela ausência de 5-lipoxigenase**. 2009. 45 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2009.

RESUMO

Listeriose é uma doença encontrada por todo mundo e atinge tanto humanos quanto animais. Sua importância deve-se ao fato de causar doença severa e possuir a maior taxa de mortalidade entre as infecções alimentares, cerca de 30%. Por anos *Listeria monocytogenes* é utilizada como modelo experimental para infecção intracelular, principalmente contribuindo para desvendar o funcionamento da resposta imunológica a estes patógenos. Sabe-se que na infecção por *L. monocytogenes* principalmente o fator de necrose tumoral alfa (TNF-alfa), interferon-gama (INF- γ), interleucina-1 (IL-1), interleucina 6 (IL-6) e óxido nítrico (NO) possuem papel crucial no controle da infecção. Os leucotrienos são mediadores inflamatórios muito relacionados com doenças inflamatórias crônicas, porém pouco se sabe em relação a inflamações agudas, entre elas as infecções. O camundongo ALOX possui uma deleção genética para produção de 5-lipoxigenase, o que o torna deficiente na produção de leucotrienos. Utilizando este camundongo em uma infecção por *L. monocytogenes* em comparação com seu controle não foi encontrada diferenças significantes entre os resultados, a dosagem de plasmática de nitrato durante o curso da infecção sofreu um aumento contínuo. A contagem bacteriana não demonstrou diferenças significativas entre os grupos. A IL-6 foi o mediador inflamatório com maior aumento entre os mediadores pesquisados, porém novamente sem diferença entre os grupos.

Palavras-chave: *L. monocytogenes*. Listeriose. 5-lipoxigenase. Leucotrienos. Interleucina-6.

KAKITANI, Daniel Hideo. **5-lipoxygenase deficiency did not influence the immune innate response in *L. monocytogenes* early infection.** 2009. 45 p. Dissertation (Master's Degree in Microbiology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2009.

ABSTRACT

Listeriosis is a disease found worldwide in human and animals. Its importance relies in the ability of causing severe disease and having a high mortality rate among food infections, about 30%. For years *L. monocytogenes* has been used as an experimental model for intracellular infection, particularly helping to unravel the functioning of the immune response to this pathogen. It is known that infection by *L. monocytogenes* induces an immune response with production of: tumor necrosis factor alpha (TNF- α), interferon-gamma (INF- γ), interleukin-1 (IL-1), interleukin 6 (IL-6) and nitric oxide (NO) factors which have crucial role in controlling the infection process. The leukotrienes are inflammatory mediators closely related to chronic inflammatory diseases, but little is known about their role regarding the acute inflammation, including infection. Mice used in this study have a genetic deletion for production of 5-lipoxygenase, which makes them deficient in the production of leukotrienes. Using these mice and *L. monocytogenes*, no significant differences were observed in the results obtained in the determination of plasma nitrate during the course of infection when compared to wild type animals, even though it has increased continuously. The bacterial survival had no significant differences between groups. IL-6 showed the highest values among the factors studied, however no difference between groups was observed.

Keywords: *L. monocytogenes*. Listeriosis. 5-lipoxygenase. Leukotrienes. Interleukin-6.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	7
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	9
1. <i>Listeria monocytogenes</i> : O lobo em pele de cordeiro da Microbiologia?.....	9
2. Determinantes de virulência	12
2.1 Internalinas	12
2.2 Ami	14
2.3 p60 e Proteínas Relacionadas	14
2.4 Listeriolisina O (LLO)	15
2.5 Act A - Proteína Polimerizadora de Actina	16
3. Epidemiologia.....	17
4. Resposta imunológica	17
OBJETIVOS	22
Objetivo geral	22
Objetivos específicos	22
REFERÊNCIAS	23
ARTIGO	28

INTRODUÇÃO

Infecções em humanos e animais pela bactéria do gênero *Listeria* são comuns por todo mundo. Infecções em humanos resultando em doença severa (como meningite e sepse) e às vezes fatal (com mortalidade de 30%) são predominantemente causadas por *Listeria monocytogenes* sorotipos 1/2b e 4b.

O ciclo de infecção natural inicia-se após a ingestão e passagem pelo estômago, onde a acidez e o ambiente hostil ativam o gene *prfA*, fator A regulatório positivo, o qual ativa a transcrição de internalinas A e B (*inlA* e *inlB*), responsáveis pela adesão e transposição bacterianas, por ligação específica em superfície celular, seguindo-se a vacuolização. Uma vez dentro da célula, ocorre a ativação de listeriolisina O (gene *hly*) e da fosfolipase C (*plcB*) responsáveis pela lise do vacúolo no macrófago, a bactéria permanecendo, após lise, livre no citosol celular. Em seguida é ativado *actA*, gene responsável pela indução de polimerização de filamentos de actina, e conseqüentemente pela invasão intracelular e célula a célula, da bactéria. Este mecanismo explica como *L. monocytogenes* invade células e atravessa barreiras do hospedeiro, alcançando assim a via hematogênica e se instalando inicialmente no fígado e no baço, onde se replica. A partir deste foco causa uma bacteremia secundária levando à sepse, para então chegar ao sistema nervoso central, causando meningite.

Como *L. monocytogenes* possui a capacidade de sobreviver dentro do macrófago, medidas específicas de defesa do hospedeiro devem ser tomadas a fim de debelar a infecção. Para isto, o sistema imunológico faz uso de citocinas e radicais livres, otimizando assim a fagocitose, principalmente o fator de necrose tumoral alfa (TNF-alfa), interferon-gama (INF- γ), interleucina-1 (IL-1), interleucina 6 (IL-6) e óxido nítrico (NO).

Por décadas o modelo murino tem sido utilizado para o entendimento da resposta imunológica, e sendo uma bactéria intracelular, *L. monocytogenes* tem sido usada como modelo experimental para pesquisas sobre resposta imunogênica inata e celular a este tipo de patógeno. Modelos

murinos apresentando deleções genéticas que tem contribuído para o entendimento destes fatores na resposta imunológica, como o camundongo ALOX (gene 5-LO nocaute), que possui atividade inflamatória reduzida devido ao bloqueio de síntese de leucotrienos, através da deficiência da enzima lipoxigenase do ciclo do ácido araquidônico.

O objetivo deste trabalho foi verificar a importância dos leucotrienos na resposta imunológica frente a *L. monocytogenes* quanto à produção de citocinas, interleucinas e NO, e alteração de sua patogênese por avaliação histopatológica e contagem de bactérias no sangue, baço e cérebro. Para tanto foi utilizado camundongo 129 ALOX, com gene nocaute para 5-lipoxigenase (5-LO), e seu controle 129WT. A infecção com *L. monocytogenes* foi realizada via intracardiaca, e o acompanhamento foi realizado pela determinação de citocinas, interleucinas e óxido nítrico, unidades formadoras de colônias bacterianas viáveis no tecido, e de histopatologia, ao longo do processo infeccioso.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. *Listeria monocytogenes*: O lobo em pele de cordeiro da Microbiologia?

Listeria monocytogenes é uma bactéria gram-positiva, descrita pela primeira vez em Cambridge, como agente de doença em coelhos e cobaias, caracterizada por intensa monocitose, por Murray, Webb & Swan (1926). No ano seguinte, Pirie (1927) isolou um bastonete gram-positivo de gerbils selvagens, na África do Sul, ao qual propôs o nome genérico *Listerella* em homenagem a Lord Lister, famoso cirurgião britânico, Murray, e Pirie concluíram que se tratava da mesma bactéria e a denominaram *Listerella monocytogenes*. Por questões taxonômicas, anos após, este, foi alterado para *Listeria monocytogenes*. (PIRIE, 1940)

A correlação desta bactéria com doença em humanos foi descrita por Nyfeldt (1929) com o isolamento de *L. monocytogenes* a partir de hemocultura de pacientes com infecção semelhante à mononucleose (manifestação rara da doença). E em 1936, nos Estados Unidos, Burn estabeleceu a listeriose como causa de sepse em recém - natos e de meningite em adultos (GRAY, KILLINGER, 1966).

Relatos anteriores a esses existem, como o de Dumont e Cotoni (1921) sobre um soldado, com meningite. A bactéria isolada do líquido cefalorraquidiano fora identificada como “difteróide” e posteriormente foi comprovado tratar-se de *L.monocytogenes*.

Seeliger (1961) relata em detalhes, à luz dos conhecimentos da época, as características das doenças causadas por *L. monocytogenes*, dos sorotipos isolados de doença em humanos e animais em diferentes países, sem, no entanto, fazer menção aos alimentos como fonte de infecção. Esta referencia permanece como indispensável, acrescida de atualizações necessárias, para aqueles que pretendem estudar e entender esta bactéria e sua interação com o homem e a natureza,

Com a implicação desta bactéria em infecções alimentares sua importância desencadeou inúmeros trabalhos de pesquisa que resultaram no entendimento melhor de sua epidemiologia, patogenia e genética.

A primeira evidencia de transmissão desta bactéria, por alimento, ocorreu no Canadá em 1981, quando foi incriminada a “coleslaw salad” (SCHLECH. ET AL., 1983). Em seguida ocorreram, outros surtos, com leite pasteurizado (FLEMING, ET AL.1985), e queijo (LINNAN ET AL, 1988).

Desde então, a descrição de surtos de origem alimentar tem aumentado na Europa e nos EUA. Estimativas recentes colocam a listeriose como segunda e quarta causas mais comuns de morte por infecção alimentar nos EUA (MEAD, ET AL., 1999) e Grã-Bretanha (ADAK, ET AL, 2002.), respectivamente.

Em doenças de humanos, *L. monocytogenes* é a espécie mais freqüentemente isolada, sendo raros os casos descritos com *L. ivanovii* e *L. seeliger* (MCLAUHLIN, 1997; ROCOURT ET AL, 1986).

A incidência da doença em humanos aumenta com idade e em alguns grupos específicos como imunodeficientes e grávidas. Crianças, recém-nascidos, com listeriose, que sobrevivem as primeiras 48h, com freqüências, desenvolveram sepse neonatal severa e meningite (SEELIGER, and LANGER, 1989).

Como a primeira espécie descrita foi *L. monocytogenes* e é a mais freqüentemente isolada, a maioria dos estudos tem sido realizada com esta espécie.

São bastonetes gram-positivos, podem se apresentar isolados, formar cadeias curtas e pleomórficos, com freqüência, confundidos com “difteróides”. Em uma das extremidades, apresenta de 1 a 4 flagelos, responsáveis pela sua motilidade característica, em cambalhotas.

Não são exigentes quanto ao cultivo, valores de pH menores que 5 diminuem mas não inibem totalmente seu crescimento , devido à baixa competitividade, seu isolamento, a partir de material com alto nível de contaminação, exige a introdução de inibidores aos meios de cultivo, como antimicrobianos, corantes, sais, derivados de acridina. Em ágar-sangue, pode apresentar halo discreto de beta hemólise. O primeiro meio cromogênico foi

descrito em 1997 (OTTAVIANI ET AL); atualmente grande número de formulações estão disponíveis sendo de grande utilidade para o isolamento desta bactéria a partir de alimentos e outros materiais.

A capacidade desta bactéria, permanecer viável em temperatura de resfriamento (problema para conservação de alimentos), enquanto a grande maioria das outras é inibida, foi, inicialmente, utilizada como método de enriquecimento (crio enriquecimento) para seu isolamento.

Quanto à estrutura antigênica, dois antígenos; somático, antígeno O (peptidoglicano + ácidos lipoteicóicos) e flagelar, H (proteína), permitem, com diferentes combinações de ambos, sua classificação antigênica (SEELINGER, 1961).

Atualmente, são consideradas as seguintes sorovariedades para *L. monocytogenes*: 1/2 a, 1/2 b, 1/2 c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4ab, 4b, 4c, 4d, 4e e 7 (MC LAUHLIN, JONES, 1998).

L. monocytogenes “sensu latu” foi desdobrada em 6 espécies, sendo duas, patogênicas *L. monocytogenes* “sensu stricto” e *L. ivanonii* (SEELIGER, 1984).

As quatro espécies não patogênicas compreendem:

-*L. innocua* (SEELIGER, SCHOOF, 1981)

-*L. welshimeri* sp (ROCOURT, GRIMONT, 1983).

-*L. seeligeri* sp. (ROCOURT, GRIMONT, 1983);

-*L. grayi* sp. (ERREBO-LARSEN, SEELIGER, 1966)

-*L. murrayi*, após estudos moleculares passou a ser considerada subespécies de *L. grayi* (ROCOURT ET AL, 1992)

Devido à grande importância desta bactéria, em doenças no homem e em animais, e na indústria de alimentos, seu isolamento e sua identificação estimularam a busca de inúmeras metodologias. Assim, além da grande variedade de meios seletivos, métodos imunológicos para sua classificação antigênica, e molecular foram desenvolvidos. Dentre os métodos moleculares existem aqueles utilizados para identificação dos gêneros e das espécies e de genes responsáveis pela síntese de fatores de patogenicidade (LIU ET AL, 2008).

2. Determinantes de virulência

A complexidade da virulência desta bactéria despertou o interesse de profissionais de diferentes áreas como bacteriologia, imunologia e biologia molecular, originando grande número de pesquisas e publicações.

L. monocytogenes é patógeno intracelular facultativo que induz sua ingestão por células não fagocíticas e se dissemina de uma célula a outra, utilizando a actina no processo de motilidade para sua instalação no hospedeiro. Além disso, tem a capacidade de atravessar as barreiras intestinal, hemato-encefálica e placentária, eventos constituem o cerne da fisiopatologia da listeriose humana (LECUIT, COSSART, 2002). Apresenta ainda, a capacidade de invadir e se multiplicar no interior de células epiteliais e macrófagos. Após sua invasão, a bactéria lisa o vacúolo de internalização e atinge o citoplasma onde ocorre sua replicação. Uma vez no citoplasma da célula hospedeira, a bactéria utiliza a actina para sua motilidade sendo propelida no citosol, invadindo as células vizinhas com a formação de protusões de dupla membrana, resultando na formação de vacúolo secundário. A seguir, este compartimento é lisado permitindo novo ciclo de infecção intracelular, em células adjacentes (DRAMSI, COSSART, 1998).

O conhecimento detalhado das interações *Listeria* – hospedeiro – célula, levou à geração do primeiro modelo transgênico utilizado para avaliar o papel de um fator de virulência bacteriano *in vivo* (LECUIT ET AL, 2001).

Os aspectos moleculares dos fatores de virulência, que contribuem para a patogenicidade de *L. monocytogenes*, podem ser divididos em: determinantes moleculares envolvidos em adesão e invasão de células eucariotas e aqueles ligados à sobrevivência intracelular. Dentre os primeiros destacam-se: internalinas (InlA e InlB); ami; p60; LLO e ActA.

LLO e ActA são também essenciais para a sobrevivência intracelular desta bactéria assim como Sortases e a proteína Auto.

2.1 Internalinas

As internalinas A e B foram os primeiros fatores de *Listeria* identificados como mediadores de invasão em células alvo (GAILLARD et al,

1991).

Seus receptores celulares foram identificados e as cascatas de finalização moleculares desencadeadas durante a invasão por *Listeria* de células do hospedeiro, estão caracterizados em detalhes (BIERNE, COSSART, 2002) (COSSART et al, 2003).

No entanto, descobertas recentes sugerem que outras moléculas podem ser responsáveis por adesão e/ou internalização, revelando um diálogo complexo entre *Listeria* e célula eucariótica, durante as etapas iniciais do ciclo de infecção.

Internalina A (Inl. A) pertence a um grupo de proteínas envolvidas na invasão das células epiteliais e desempenha atividade chave na passagem da barreira intestinal.

Regiões repetidas ricas em leucinas (LRRs) e uma região entre repetição (IR) são necessárias e suficientes para promover a entrada desta bactéria em células epiteliais humanas (LECUIT et al, 1997). O receptor para Inl. A é a E-caderina (MENGAUD et al, 1996). Este receptor pertence à superfamília de caderina, das moléculas de adesão celulares; são glicoproteínas presentes nas transmembranas, localizadas principalmente nas junções de adesão e permitem adesão célula-célula, cadeia-dependente. Inl A aparece truncada em algumas cepas que ocorrem naturalmente (BIERNE et al, 1998), enquanto levantamento epidemiológico indica que isolados clínicos expressam Inl A completa, com maior frequência (96% dos casos) que isolados de alimentos (65% dos casos) (JACQUET et al.2004.), sugerindo que Inl. A é crítica para a patogênese de listeriose humana e que, portanto, pode ser utilizada como marcador de virulência em programas de avaliação de segurança em alimentos.

Internalina B (Inl.B), proteína (GW) de superfície da família multigênica da internalina, alocada no mesmo operon que Inl.A . Atua como invasina bem como fator de crescimento.

Está envolvida com a entrada de *Listeria* em várias linhagens celulares incluindo hepatócitos e células não epiteliais. Seu domínio terminal carboxil medeia à ligação de Inl. B com a parede bacteriana, através de interação não-covalente com ácidos lipoteicóicos (JONQUIERES et al, 1999).

A região LRR fr Inl. B é capaz de conferir a capacidade de invasão à bactéria não invasiva *L. innocua*. O fator de crescimento de hepatócitos, ou Met, foi identificado como principal receptor de Inl. B em células alvo. Met pertence à família de receptores de tirosina quinase (BRAUN et al, 1999).

2.2 Ami

É uma Autolisina GW envolvida em adesão, uma amidase que apresenta um domínio amino-terminal semelhante ao da amidase Atl (autolisina) de *Staphylococcus aureus*. Além de sua atividade lítica em paredes celulares de *Listeria*, está envolvida em adesão bacteriana a células alvo em Δinl AB e seu ancoramento à parede da célula é capaz de restaurar a capacidade de adesão de mutantes *ami* com background Δinl AB (MILOHANIC et al, 2001) Mutantes *ami* são atenuados indicando que Ami desempenha função na virulência de *L. monocytogenes*.

O significado de autolisinas com propriedade adesiva, não está claro.

Existe a hipótese de que autolisina, adesinas seriam fatores de colonização primitivos permitindo à bactéria interagir com superfícies que expressam moléculas análogas a seus receptores naturais (ácidos teicóicos ou lipoteicóicos).

2.3 p60 e Proteínas Relacionadas

L. monocytogenes expressa inúmeras proteínas secretadas, associadas à parede celular, com atividade autolítica. A proteína p60 está presente também na superfície da célula bacteriana e apresenta atividade de mureína, hidrolase, a qual parece estar envolvida em etapas tardias da divisão celular.

O gene desta proteína, inicialmente denominado *iap* (invasion associated protein) codifica uma proteína bastante básica, de 484 aminoácidos (MENGAUD et al, 1991a) (MENGAUD et al, 1991b). Mutantes com *iap* deletado são afetados durante a formação de septo. Assim, o gene que

codifica p60 foi renomeado de *iap* para *cwhA* (cell wall hydrolase A) (Kuhn, Goebel 1989).

Outra peptidoglican-hidrolase descrita é a Mur A, ou p66, cujo gene apresenta homologia com o de p60 em seu domínio C-terminal, está envolvido com a divisão celular e parece atuar em conjunto com p60. No entanto, sua atuação na infecção “*in vivo*” ou “*in vitro*” é ainda desconhecida. (KUHN, SCORTTI, VÁZQUEZ-BOLAND, 2008).

2.4 Listeriolisina O (LLO)

É uma toxina formadora de poros, bem como uma molécula sinalizadora potente. Esta proteína secretada tem como receptor o colesterol e está envolvida na saída de *L. monocytogenes* dos vacúolos primário e secundário. Respostas celulares são detectadas pela estimulação com esta proteína: secreção de interleucina nos macrófagos, indução de apoptose, degranulação ou geração de leucotrienos em neutrófilos e células endoteliais e outras. Muitas destas respostas são Ca^{2+} dependentes e, além disso, o influxo de Ca^{2+} extracelular potencializa a entrada de *Listeria* em células HEp-2 (DUSSURGET ET AL, 2004).

A Listeriolisina O (LLO) é o determinante essencial para a liberação da bactéria dos vacúolos primários e secundários, tanto que mutantes no gene *hly* não atingem o citoplasma e são avirulentas. LLO é uma proteína secretada, pertencente à família das citotoxinas formadoras de poros, tiol-ativadas, dependentes de colesterol, para as quais a estreptolisina O é o protótipo.

A atividade de LLO ocorre em valores baixos de pH. Autores demonstraram que a formação de poros por LLO atinge seu ótimo entre 5.5 e 6.0 (pH encontrado na etapa inicial do fagossomo).

Além da LLO, duas fosfolipases e uma metaloprotease cooperam com LLO na ruptura da membrana do fagossoma. Essas enzimas são as responsáveis pela liberação, independente de LLO, desta bactéria, dos vacúolos primários. Uma fosfolipase é codificada pelo gene *plcA* que se encontra na ilha de patogenicidade LIPI-1. É a fosfolipase C, altamente

específica para fosfatidilinositol (PI-PLC). A faixa ampla de pH desta enzima, 5.5 a 7.0 coincide com seu papel na ruptura de vacúolos fagocíticos acidificados.

A segunda fosfolipase hidrolisa fosfatidilcolina, componente principal da lecitina e é por isso denominada lecitinase ou PC-PLC. Esta enzima também hidrolisa fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina e sfingomiéline, mas não fosfatidilinositol. PC-PLC é uma fosfolipase zinco-dependente e sua participação principal na patogênese de *Listeria* ocorre na lise da dupla membrana fagossomal formada após a disseminação da bactéria célula a célula.

A metaloprotease Mpl de *L.monocytogenes* contribui para a proliferação intracelular e virulência no processo proteolítico de transformação da pro-PC-PLC em sua forma ativa. Seu gene se encontra próximo ao *hly* na ilha de patogenicidade LIPI-1 e é o primeiro gene do operon da lecitinase (KUHN, SCORTTI, VÁZQUEZ-BOLAND, 2008).

2.5 Act A - Proteína Polimerizadora de Actina

É uma proteína de superfície responsável pela motilidade baseada em actina, desta bactéria. Sua participação em adesão e invasão de células alvo tem sido relatada. Assim, mutantes deficientes em ActA apresentam deficiência desses mecanismos frente a macrófagos murinos e células CHO, devido à função alterada de reconhecimento Act A proteína de superfície é único fator bacteriano responsável por essa atividade (DUSSURGET ET AL, 2004).

Após a lise do vacúolo, *Listeria* do citosol induz a polimerização dos filamentos de actina que promovem o movimento intracelular da bactéria e a disseminação de célula a célula (DUSSURGET ET AL, 2004).

As bactérias movendo-se ao extremo da calda de actina (cometa) podem formar protrusões que serão engolfadas pelas células vizinhas. Alguns aspectos deste mecanismo não estão elucidados e são necessários, portanto, mais estudos detalhados sobre o assunto.

Mais recentemente, foi descrito o Regulon PrfA que regula todos os genes de virulência de *Listeria*, cuja análise completa foi possível com o seqüenciamento do genoma desta bactéria. Foi comprovado assim, que outros genes anteriormente não descritos, também eram regulados por PrfA. Este regulon apresenta um termosensor capaz de controlar, além dos genes de virulência, genes heterólogos.

São ainda descritas as sortases, transpeptidases envolvidas com a ancoragem de proteínas de superfície e de virulência, na parede bacteriana; e Auto, nova autolisina relacionada à virulência, em particular à invasão de células eucarióticas pós a lise do vacúolo, a *Listeria* no citosol induz a polimerização dos filamentos de actina que promovem o movimento intracelular da bactéria e a disseminação de célula a célula (DUSSURGET ET AL, 2004).

3. Epidemiologia

A incidência anual de listeriose é de 0,7 casos por 100 000, sendo maiores em idosos (2,1 casos/100 000) e gestantes (12 casos/100 000). Sua importância frente à baixa incidência deve-se ao fato da listeriose ser uma infecção grave, podendo levar a sepse e meningite, gravidade esta que resulta em mortalidade elevada, aproximadamente 30%, o que a torna a mais alta taxa de mortalidade entre as infecções alimentares. Mesmo entre as meningites comunitárias, a *L. monocytogenes* é o terceiro agente etiológico mais prevalente, com 11% dos casos (SOUTHWICK; PURICH, 1996).

Pacientes com déficit imunológico, como AIDS, transplantados, pacientes com câncer, possuem um risco aumentado de 100 a 300 vezes. Atingindo incidência de 200 casos por 100 000 em pacientes pós transplante de órgãos sólidos e a 115 casos em pacientes com AIDS. (LIU, 2008)

4. Resposta imunológica

A infecção experimental em camundongos tem sido utilizada por décadas para estudo da resposta imunológica, a utilização de *L. monocytogenes* como

modelo de infecção por microrganismo intracelular teve seu início na década de 60 (ZENEWICZ E SHEN, 2007), sendo utilizada para estudos sobre imunidade inata e adaptativa, por estes anos.

O curso natural de infecção por *L. monocytogenes* inicia-se após ingestão de alimento contaminado. Esta bactéria possui a capacidade de sobreviver à acidez do suco gástrico, atingindo o trato intestinal, onde utiliza seu receptor específico para células epiteliais humanas para invadir o tecido e atingir o sistema circulatório, atravessando a barreira intestinal, utilizando-se da produção de filamentos de actina para realizar a invasão de tecidos adjacentes (LECUIT, 2005). Uma vez no sistema circulatório ela é filtrada pelo fígado e baço, onde se inicia nova invasão celular devido a seu receptor específico para células do sistema retículo - endotelial (GREGORY E LIU, 2000).

A resposta imune inata é necessária para o controle inicial da infecção de *L. monocytogenes*, e a resposta adaptativa, responsável pelo clearance da infecção, começa a se desenvolver a partir do quinto dia após a infecção (ZENEWICZ E SHEN, 2007).

Uma vez no fígado e baço, inicia-se no macrófago a resposta imune inata (COUSENS E WING, 2000). Os macrófagos tem sido o foco da imunidade inata durante a infecção por *L. monocytogenes*, pois a replicação desta se inicia e é a célula essencial para mediar à defesa contra a bactéria. Macrófagos residentes, principalmente as células de Kupffer no fígado, são os responsáveis pela morte da maioria das bactérias da infecção inicial (ZENEWICZ E SHEN, 2007). Os macrófagos por si só não são capazes de eliminar a bactéria, e com esta invasão inicia-se a produção de mediadores inflamatórios, que possuem ação importante na defesa contra a *L. monocytogenes* (COUSENS E WING, 2000).

Os principais mediadores inflamatórios na resposta imunológica inata contra este microrganismo são: interferon gama ($INF\gamma$), fator de necrose tumoral alfa ($TNF-\alpha$), interleucina 1 (IL-1) e interleucina 6 (IL-6) estes mediadores, além de serem os primeiros a serem secretados durante a infecção bacteriana, ainda possuem forte conexão entre eles (LIU ET AL, 1995).

Estudos têm evidenciado a importância de TNF, pois na ausência desta citocina, a resposta imune inata não consegue controlar a infecção por *L. monocytogenes* (VIRNA ET AL, 2006), e a administração de anti-TNF em

camundongos fazem infecções subletais de *L. monocytogenes* se tornarem letais aos animais. O TNF altera o recrutamento de leucócitos in vivo, prioriza neutrófilos para atividade oxidativa e ativa macrófagos (LIU ET AL, 1995).

A IL-12 e TNF- α agem em sinergia levando as células NK à produção de INF γ (Cousens e Wing, 2000). Interferon gama (INF γ) provavelmente seja a citocina mais importante no controle da infecção primária por *L. monocytogenes*, o que se compara com camundongos deficientes em INF γ são mais sensíveis a infecção por *L. monocytogenes*. Entretanto possui um papel menor na reinfecção (ZENEWICZ E SHEN, 2007). O INF- γ por sua vez aumenta a resposta do macrófago a *L. monocytogenes* inibindo seu crescimento, ainda há controvérsia em como o INF γ estimula o macrófago (COUSENS E WING, 2000).

As interleucinas IL-6 e IL-1 são necessárias ao hospede para a resistência a *L. monocytogenes*, porém os mecanismos envolvidos não estão bem definidos, entretanto seus mecanismos são diferentes da resposta regulada pela IL-12, TNF- α e INF γ . Também camundongos com deficiência em IL-6 são mais sensíveis a infecção por *L. monocytogenes* genes (COUSENS E WING, 2000).

A IL-1 aumenta a ativação de células T e esta envolvida na quimiotaxia de neutrófilos, entretanto não esta presente na circulação periférica durante infecção por *L. monocytogenes* em camundongo (LIU ET AL, 1995). IL-1 tem se mostrado um potencial indutor de IL-6. Anti-IL-6 administrado durante infecção por *L. monocytogenes*, inibe o efeito protetor causado pela administração de IL-1 recombinante em camundongos, evidenciando que o efeito protetor de IL-1 necessita da presença de IL-6 (LIU ET AL, 1995).

A IL-6 é a principal citocina na resposta imunológica a infecção por *L. monocytogenes* na fase de resposta aguda. Sua principal fonte de síntese são as células de Kupffer no fígado (GREGORY ET AL, 1998). Níveis séricos de IL-6 estão correlacionados com a quantidade de bactéria (LIU ET AL, 1995).

Um dos fatores pelo qual a falta de TNF diminui o controle da infecção por *L. monocytogenes* é a expressão reduzida de iNOS (síntese óxido nítrico induzível) (VIRNA ET AL, 2006).

No baço a expressão de mRNA para INF γ e TNF- α e são induzidos ao máximo no primeiro dia da infecção. O mRNA para iNOS aparece logo depois (BOOKVAR ET AL, 1994).

Considerando que a síntese de uma enzima ativa requer vários cofatores e a conversão de NO é realizada via vários intermediadores do nitrato, o pico de síntese de NO geralmente ocorre entre o dia 2 a 5 da infecção. Sendo os macrófagos do fígado e baço como fonte de excreção de nitratos na infecção primária de *L. monocytogenes*. A inibição da produção de NO em camundongos infectados por *L. monocytogenes* mostrou exacerbação da infecção, evidenciando assim o efeito protetor de NO no curso da infecção (BOOKVAR ET AL, 1994).

Toll like receptor 2 (TLR2) tem receptores para bactérias gram positivas e possui papel importante na resistência a infecção (TORRES, 2004). Camundongos com gene nocaute para TLR2 tem menor ativação de macrófagos e maior mortalidade em comparação com selvagem para infecção por *L. monocytogenes* (TORRES, D., 2004), e secretam menos TNF α , INF γ , IL-1 e IL-12 (ZENEWICZ E SHEN, 2007).

Os leucotrienos são sintetizados predominantemente em células de origem mielóide através do metabolismo do ácido araquidônico pela via da 5-Lipoxigenase (5-LO) (FUNK E CHEN, 2000). São formados a partir de um hidroperóxido (5-HPETE) o qual é transformado em LTA₄ com a formação de um grupamento epóxido (oxigênio ligando os carbonos 5 e 6). Este é instável e pode sofrer hidrólise enzimática gerando o LTB₄ ou então receber um resíduo de glutatona gerando o leucotrieno C₄ (LTC₄). A retirada enzimática do ácido glutâmico do LTC₄ da origem ao LTD₄ e com a retirada da glicina do LTD₄ forma-se o LTE₄ (PETERS-GOLDEN E HENDERSON, 2007).

Leucotrieno B₄ possui capacidade de quimiotaxia a neutrófilos, adesão celular e indução de degranulação e liberação de enzimas lisossomais do neutrófilo. Além de agir na modulação da resposta imunológica estimulando principalmente a produção de IL-6 (HENDERSON, 1994). Assim sendo os leucotrienos aumentam a capacidade do macrófago e neutrófilo a exterminar micróbios e a produzir mediadores, e a sua falta leva a uma diminuição da resposta imunológica a bactérias (PETERS-GOLDEN E HENDERSON, 2007). Porém a listeriolisina induz pouca resposta de leucotrienos (SCHEFFER ET AL, 1988).

Após apresentação de antígenos bacterianos provenientes da infecção por *L. monocytogenes* por via MHC classe 1 a células T CD8, inicia-se a resposta por células CD8 citotóxicas contra *L. monocytogenes* (LARA-TEJERO E PAMER, 2004).

Células CD8 citotóxicas agem lesando as células infectadas com perforinas para expor bactérias intracelulares e serem destruídas por macrófagos ativados, e secretando $\text{INF}\gamma$ ativando macrófagos (ZENEWICZ E SHEN, 2007).

Há uma resposta importante também pelas células T CD4 de memória durante o curso de infecção por *Listeria* em indivíduos imunizados, T CD4 produzem grandes quantidades de citocinas Th1 que contribuem para a resposta a infecção contra *Listeria* (LARA-TEJERO E PAMER, 2004).

OBJETIVOS

Objetivo geral:

Determinar as possíveis alterações durante o ciclo infeccioso por *L. monocytogenes* na infecção em camundongos com gene nocaute para 5-lipoxigenase, provindas da falta de leucotrienos e camundongo selvagem.

Objetivos específicos:

Avaliar a presença de citocinas inflamatórias no plasma de camundongos na ausência de 5-lipoxigenase, durante o ciclo infeccioso por *L. monocytogenes*.

Avaliar a produção de óxido nítrico no plasma na ausência de 5-lipoxigenase durante o ciclo infeccioso da *L. monocytogenes*.

Realizar análise histopatológica do baço obtido dos animais.

Realizar contagem das unidades formadoras de colônias de bactérias obtidas de sangue, baço e cérebro dos dois grupos de animais.

REFERÊNCIAS

ADAK, G.K., LONG, S.M., AND O'BRIEN, S.J., Trends in indigenous food-borne disease and deaths, England and Wales: 1992 to 2000, *Gut*, 51, 832, 2002.

BIERNE H., COSSART P., Inl B, a surface protein of *Listeria monocytogenes* that behaves as an invasin and growth factor. *J. Cell Sci.* 115:3357-67.

BOOKVAR, KENNETH S. ET AL; Nitric Oxid Produced during Murine Listeriosis is Protective; *Infection and Immunity*; 62: 1089-1100; 1994.

BRAUN L., NATO F., PAYARASTRE B., MAZIE, J. C., COSSART P. The 213-amino-acid-leucine-rich repeat region of the *Listeria monocytogenes* Inl B protein is sufficient for entry into mammalian cells, stimulation of PI3-kinase and membrane ruffling. *Mol. Microbiol.* 34:10-23, 1999.

COSSART P., PIZARRO-CERDA J., LECUIT M. Invasion of mammalian cells by *Listeria monocytogenes*: functional mimicry to subvert cellular functions. *Trends Cell Biol.* 13:23-31. 2003.

COUSENS, LESLIE P. E WING, EDWARD J., Innate defenses in the liver during *Listeria* infection; *Immunological Reviews*; Vol. 174; 150-159; 2000.

DOUMITH, M., ET AL. New aspects regarding evolution and virulence of *Listeria monocytogenes* revealed by comparative genomics. *Infect. Immun.* 72: 1072-83, 2002.

DOUMITH, JACQUET C., M., GORDON J. L., MARTIN P.M., COSSART P., LECUIT M. A molecular marker for evaluating the pathogenic potential of foodborne *Listeria monocytogenes*. *J. Infect. Dis.* 189:2094-100, 2004.

DRAMSI, S., COSSART, P. Intracellular pathogens and the actin cytoskeleton. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 1998.

DUMONT, J. COTONI, L.. Bacille semblable a celui de Rouget du porc rencontre dans l'ê L.C.R. d'um meningitique. *Annls Inst. Pasteur, Paris*, 35, 6, 1921.

DUSSURGET, O., PIZARRO-CERDA, J. AND COSSART, P., Molecular determinants of *Listeria monocytogenes* virulence, *Annu. Rev. Microbiol.*, 58: 587-610, 2004

ERREBO-LARSEN, H., AND SEELIGER, H.P.R., A mannitol fermenting *Listeria*: *Listeria gravi* sp. n. Proc. 3rd Int. Symp. Listeriosis, Biltoven, The Netherlands, 1966, 35–39.

FLEMING, D. W. et al., Pasteurized milk as a vehicle of infection in an outbreak of listeriosis, *New Engl. J. Med.* 312, 404, 1985

FUNK, COLIN D. E CHEN, XIN-SHENG; 5-Lipoxygenase and Leukotrienes: Transgenic Mouse and Nuclear Targeting Studies; *Am J Respir Crit Care Med*; 161: 120-124; 2000.

GAILLARD J.L., BERCHE P., FREHEL C., GOUIN E., COSSART P.. Entry of *Listeria monocytogenes* into cells is mediated by internalin, a repeat protein reminiscent of surface antigens from gram-positive cocci. *Cell* 65:1127-41, 1991.

GRAY, M.L., AND KILLINGER, A.H., *Listeria monocytogenes* and listeric infection, *Bacteriol. Rev.*, 30, 309, 1966.

GREGORY, STEPHEN H. ET AL; IL-6 Produced by Kupffer Cells Induces STAT Protein Activation in Hepatocytes Early During the Course of Systemic Listerial Infections; *The Journal of Immunology*; 160: 6056-6061; 1998.

GREGORY, STEPHEN H. E LIU, CHAU-CHING; CD8+ T-cell-mediated response to *Listeria monocytogenes* taken up in the liver and replicating within hepatocytes; *Immunological Reviews*; 174: 112-122; 2000.

GOULET, V. ET AL., Surveillance of human listeriosis in France, 2001–2003, *Euro Surveill.*, 11, 79, 2006.

HENDERSON, WILLIAM R.; The Role of Leukotrienes in Inflammation; *Annals of Internal Medicine*; 121: 684-697; 1994

JONQUIERES R., BIERNE H., FIEDLER F., GOUNON P., COSSART P.. Interaction between the protein Inl B of *Listeria monocytogenes* and lipoteichoic acid: a novel mechanism of protein association at the surface of gram-positive bacteria. *Mol. Microbiol.* 34:902-14, 1999.

JONQUIERES R., BIERNE H, MENGAUD J., COSSART P. The Inl A gene of *Listeria monocytogenes* LO28 harbors a nonsense mutation resulting in release of internalin. *Infect. Immun.* 66:3420-22., 1998.

KUHN M., SCORTTI M., J VÁZQUEZ-BOLAND J.A, CHAPTER 4: Pathogenesis; in: Liu, D; *Handbook of Listeria monocytogenes*; 1 ed.; New York, US; 2008; p. 97-124.

LECUIT, M.; Understanding how *Listeria monocytogenes* targets and crosses host barriers; *Clin Microbiol Infect*; 11: 430-436; 2005.

LECUIT M., OHAYON H., BRAUN L., MEGAUND J., COSSART P.. Internalin of *Listeria monocytogenes* with an intact leucinerich repeat region is sufficient to promote internalization. *Infect. Immun.* 65/; 5309-19, 1997.

LINNAN, M. J. ET AL., Epidemic listeriosis associated with Mexican-style cheese, *New Engl. J. Med.* 319,823, 1988.

LARA-TEJERO, MARIA E PAMER, ERIC G.; T cell responses to *Listeria monocytogenes*; *Current opinion in Microbiology*; 7: 45-50; 2004.

LECUIT M., COSSART P.. Genetically modified-animal models for human infections: the *Listeria* paradigm. *Trends Mol. Med.* 8:537-42, 2002.

LIU, D.;CHAPTER 2: Epidemiology; in: _____; *Handbook of Listeria monocytogenes*; 1 ed.; New York, US; p. 27-61; 2008.

LIU, D. Editor: *Handbook of Listeria monocytogenes*; 1 ed.; New York, US; p. 27-61; 2008.

LIU, Z., SIMPSON, R. J. E CHEERS, C.; Interaction of interleukin-6, tumor necrosis factor and interleukin-1 during *Listeria* infection; *Immunology*, 85; 562-567; 1995.

MCLAUCHLIN, J., The pathogenicity of *Listeria monocytogenes*: A public health perspective, *Rev. Méd. Microbiol.*, 8, 1, 1997;

MEAD, P.S. ET AL., Food-related illness and death in the United States, *Emerg. Infect. Dis.*, 5, 607, 1999.

MENGAUD J., OHAYON H., GOUNON P.,MEGE R.M., COSSART P.. E-cadherin is the receptor for internalin, a surface protein required for entry of *Listeria monocytogenes* into epithelial cells. *Cell* 84:923-32, 1996.

MENGAUD J., BRAUN-BRETON C., COSSART P. . Identification of phosphatidylinositol-specific phospholipase C activity in *Listeria monocytogenes*: a novel type of virulence factor? *Mol. Microbiol.* 5:367-72, 1991.

MENGAUD J.,GEOFFROY C., COSSART P..Identification of a new operon involved in *Listeria monocytogenes* virulence: its first gene encodes a protein homologous to bacterial metalloproteases. *Infect. Immun.* 59:1043-49, 1991.

MILOHANIC E., JONQUIERES R., COSSART P., BERCHE P., GAILLARD J. L.. The autolysin Ami contributes to the adhesion of *Listeria*

monocytogenes to eukaryotic cells via its cell wall anchor. *Mol. Microbiol.* 39:1212-24, 2001.

MURRAY, E.G.D., WEBB, R.A., AND SWANN, M.B.R., A disease of rabbits characterized by a large mononuclear leucocytosis, caused by a hitherto undescribed bacillus *Bacterium monocytogenes*, *J. Path. Bacteriol.*, 28, 407, 1926.

NYFELDT, A., Etiologie de la mononucleose infecteuse, *Compt. Rend. Soc. Biol.*, 101, 590, 1929.

OTTAVIANI, F., OTTAVIANI, M., AND AGOSTI, M., Differential agar medium for *Listeria monocytogenes*, *Quinper Froid Symp. Proc.*, June 1997.

PETERS-GOLDEN, MARC E HENDERSON JR., WILLIAM R.; Mechanisms of disease: Leukotrienes; *The New England Journal of Medicine*; 357: 1841-54; 2007.

PILGRIM S., KOLB-MAURER ^a, GENTSCHEV I., GOEBEL W., KUHN M.. Deletion of the gene encoding p60 in *Listeria monocytogenes* leads to abnormal cell division and loss of actin-based motility. *Infect. Immun* 71:3473-84, 2000.

PIRIE, J. H. H.; *Listeria*: Change of name for a genus of bacteria, *Nature*, 145, 264, 1940.

PIRIE, J.H.H., A new disease of veld rodents, "Tiger River Disease," *Publ. S. Afr. Inst. Med. Res.*, 3, 163, 1927.

ROCOURT, J. ET AL., Assignment of *Listeria gravi* and *Listeria murrayi* to a single species, *Listeria gravi*, with a revised description of *Listeria gravi*, *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 42, 171, 1992.

ROCOURT, J., GRIMONT, F., *Listeria welshimeri* sp. nov. and *Listeria seeligeri* sp. nov., *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 3, 866, 1983.

ROCOURT, J. ET AL., Meningite purulente aigue a *Listeria seeligeri* chez un adulte immunocompetent, *Schweiz. Med. Wochenschr.*, 116, 248, 1986.

SCHEFFER, J. ET AL; Comparison of Four Hemolysin-Producing Organisms (*Escherichia coli*, *Serratia marcescens*, *Aeromonas hydrophila* and *Listeria monocytogenes*) for Release of Inflammatory Mediators from Variou Cells; *Journal of Clinical Microbiology*; 26: 544-551; 1988.

SCHLECH, W. F. I. ET AL., Epidemic listeriosis—Evidence for transmission by food, *New Engl. J. Med.* 308, 203, 1983.

SEELIGER, H.P.R., AND LANGER, B., Serological analysis of the genus *Listeria*. Its values and limitations, *Int. J. Food Microbiol.*, 8, 245, 1989.

SEELIGER, H.P.R. ET AL., *Listeria ivanovii*, *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 34, 336, 1984.

SEELIGER, H.P.R., Apathogene Listerien: *Listeria innocua* sp. nov. (Seeliger und Schoofs, 1977), *Zentralbl. Bakteriол. Parasit. Infekt. Hyg. Abt. 1 Reihe A*, 249, 487, 1981.

SEELIGER, H.P.R.. *Listeriosis* S. Karger Basel, N. York. 1961.

SOUTHWICK, FREDERICK S. E PURICH, DANIEL L.; Mechanisms of Disease: Intracellular Pathogenesis of Listeriosis; *The new England Journal of Medicine*; 334 12: 770-776; 1996.

TORRES, DAVID ET AL; Toll-Like Receptor 2 Is Required for Optimal Control of *Listeria monocytogenes* Infection; *Infection and Immunity*; 72: 2131-2139; 2004.

VIRNA, SIMONA ET AL; TNF is Important for Pathogen Control and Limits Brain Damage in Murine Cerebral Listeriosis; *The Journal of Immunology*; 177: 3972-3984; 2006.

ZENEWICS, LAURE A. E SHEN, HAO; Innate and adaptive immune responses to *Listeria monocytogenes*: a short overview; *Microbes and infection*, xx, 1-8 (in press), 2007.

KAKITANI, Daniel H., SARIDAKIS, Halha O. 5-LIPOXYGENASE DEFICIENCY DID NOT INFLUENCE THE IMMUNE INATE RESPONSE IN *L. monocytogenes* EARLY INFECTION. 2009. Dissertação de Mestrado em Microbiologia – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2009.

ABSTRACT

Listeriosis is a disease found worldwide in human and animals. Its importance relies in the ability of causing severe disease and having a high mortality rate among food infections, about 30%. For years *L. monocytogenes* has been used as an experimental model for intracellular infection, particularly helping to unravel the functioning of the immune response to this pathogen. It is known that infection by *L. monocytogenes* induces an immune response with production of: tumor necrosis factor alpha (TNF- α), interferon-gamma (INF- γ), interleukin-1 (IL-1), interleukin 6 (IL-6) and nitric oxide (NO) factors which have crucial role in controlling the infection process. The leukotrienes are inflammatory mediators closely related to chronic inflammatory diseases, but little is known about their role regarding the acute inflammation, including infection. Mice used in this study have a genetic deletion for production of 5-lipoxygenase, which makes them deficient in the production of leukotrienes. Using these mice and *L. monocytogenes*, no significant differences were observed in the results obtained in the determination of plasma nitrate during the course of infection when compared to wild type animals, even though it has increased continuously. The bacterial survival had no significant differences between groups. IL-6 showed the highest values among the factors studied, however no difference between groups was observed.

INTRODUCTION

Infections in humans and animals by bacteria of the genus *Listeria* are common for both. Infections in humans, resulting in severe illness (such as meningitis and sepsis) and sometimes fatal disease (with mortality of 30%) (SOUTHWICK AND PURICH, 1996) are predominantly caused by *Listeria monocytogenes* serotypes 1/2b and 4b (LIU ET AL, 2008). In humans there is an increase in incidence with aging and immunocompromised (SEELIGER, AND LANGER, 1989).

The natural cycle of infection starts up after ingestion of contaminated food and passage through the stomach (VÁZQUEZ-BOLAND ET AL, 2001), the acid pH and the hostile environment activate the gene *prfA*, positive regulatory factor A (GRAY ET AL, 2006), which activates transcription of internalins A and B (*inlA* and *inlB*), responsible for bacterial transposition after binding to specific cell surface and are phagocytosed (LECUIT, 2005). Once inside the cell, the gene *hly* for listeriolysin O is activated (DUSSURGET ET AL, 2004) as well as phospholipase C (*plcB*) (MARQUIS, ET AL, 1997) responsible for lysis of the vacuole in the macrophage, therefore after lyses, the bacterium is free in the cell cytosol (SIBELIUS ET AL, 1998). Soon after is activated the gene for polymerization of actin filaments (SOKOLOVIC ET AL, 1996), responsible for invasion of intracellular bacteria cell to cell (Dramsí et al, 1998). This mechanism explains how *L. monocytogenes* invades cells and crosses barriers of the host thus achieving the hematogenous route settling initially in the liver and spleen (SILVERMAN ET AL, 1963) where they replicate and cause the secondary bacteremia leading to sepsis, finally reaching the central nervous system, causing meningitis (BERCHE, 1995). As *L. monocytogenes* has the ability to survive within macrophages, specific measures of host protection must be taken to eradicate the infection (DREVETS ET AL, 2004). For this, the immune system makes use of cytokines and free radicals to optimize phagocytosis, mainly tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha), interferon-gamma (INF- γ), interleukin 6 (IL-6) and nitric oxide (NO) (COUSENS, 2000).

For decades, the mouse model has been used for understanding the immune response, and as intracellular bacterium, *L. monocytogenes* has been used as an experimental model, to investigate response of innate and cellular immunity to this type of pathogen (ZENEWICS, 2007). Murine models using genetic deletions have contributed to the understanding of these aspect in the immune response, such as mouse ALOX (5-LO gene knockout), which presents reduced inflammatory activity by blocking the synthesis of leukotrienes via 5-lipoxygenase enzyme deficiency of the acid cycle arachidonic (FUNK, 2000).

The aim of this study was to access the important of leukotrienes in the immune response to *L. monocytogenes* infection. For this we used mice 129ALOX (knockout for 5-lipoxygenase -5-LO) and the wild type 129WT. bacterial infection was carried by intracardiac injection of 2×10^6 CFU of *L. monocytogenes*. Production of cytokines interleukins and nitric oxide was detected in animals plasma, viable bacterial counts were performed in blood, spleen and brain, histopathology of spleen also preformed.

MATERIAL AND METHODS

Animals

Female, Mice, 129ALOX (5-LO gene knockout) and 129WT, weighting 23 ± 2 g, kept at environmental temperature, constant humidity and dark-light cycle, were given free diet and drinking water.

Bacterium

Was used *L. monocytogenes* 4b (NCTC 5214). A batch of 300ml culture in BHI broth, incubated at 35°C for 16 hours under aeration, was dispensed in to sterile microfuge tubes kept at -80°C and used in all the experiments.

For each experiment one tube recovered and colony forming units (CFU) confirmed by plating different dilutions of the bacterial culture, on BHI plates. Bacterial growth was washed with PBS (pH 7, 2) and the adequate concentration restored, for the animal inoculations.

Infection process

Mice were inoculated intracardiacally with a suspension containing 2×10^6 CFU of *L. monocytogenes*. They were kept under conditions mentioned before. After 6, 12, 24 and 48 hours groups of mice were anesthetized and submitted to heart puncture, 100 μ L of total was spread onto *Listeria* selective agar and incubated for 24-48 hours at 36°C.

Remaining blood was centrifuged in order to obtain the plasma which was used for determining nitrite and cytokines levels. After heart puncture animals were killed by cervical dislocation, spleen and brain were excised under sterile conditions and small portion of each was fixed in formalin for histopathological analysis.

The remainder of each organ was homogenized in 1mL of PBS (pH 7.2) in glass grinder. Tenfold dilutions of each homogenate were spread onto agar plates (*Listeria* selective agar), incubated at 36°C for 24-48 hours, and CFU were counted.

Determination of plasma nitrite and estimation of plasma concentrations of nitric oxide (NO).

To estimate NO concentration in the plasma samples the technique described by Navarro-González and colleagues (1998) with some modifications was used. The method is based on the reduction of nitrate to nitrite mediated by oxy-reduction reactions occurring between the nitrate present in the sample and the system of cadmium-copper reagents, with subsequent diazotation and spectrophotometric at 550nm detection of the azocompound formed, by the addition of Griess reagent (GRIESS, 1879).

Determination of plasma cytokines

The following cytokines were determined in plasma: IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, TNF γ IL-12, IL-13, IL-17A, IL-23, IFN- α , and TGF- β 1, using the Multi-kit ELISArray Analyt Profiler™ (Superarray Bioscience Corporation, CAT # 1026 A). The kit is developed to determine the profile of 12 cytokines of patterns Th1/Th2/Th0/Th17, using the method of sandwich ELISA.

We used pooled samples of plasma obtained from the experimental groups (3 to 5 animals per group) 24 and 48 hours after infection, divided into plates of 96 wells previously sensitized with the capture antibodies specific for each antibody.

The absorbance values were determined at 450 nm in a microplate reader, 20 minutes after addition of blocking solution. Data were expressed in arbitrary units (OD), according to the values of absorbance obtained.

Histopathologic analysis of spleens

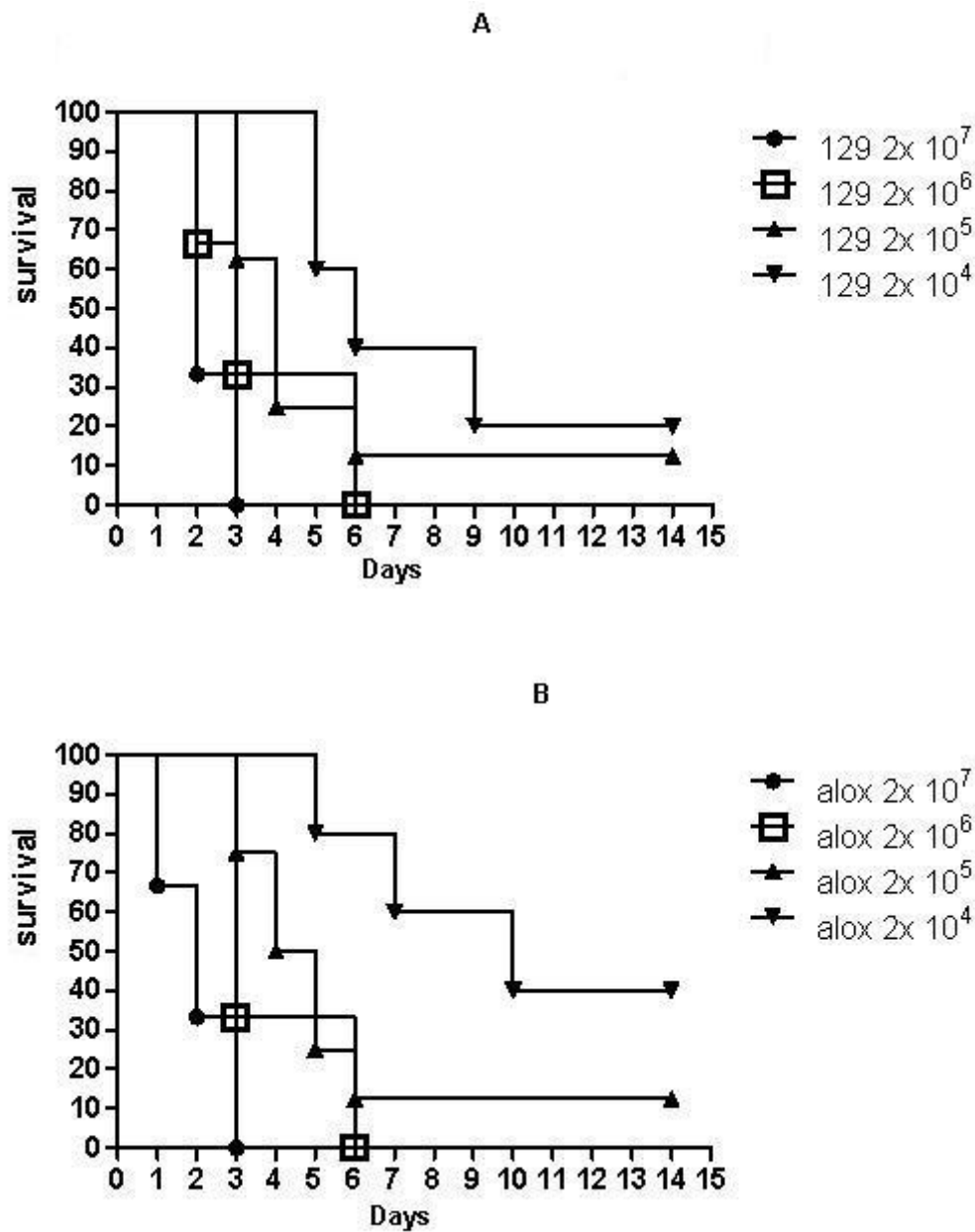
Fragments of spleens obtained were prepared and stained with hematoxylin and eosin.

Score of lesions found in white and red pulp were used to quantify the lesions. Scale is numbered 0 (no lesions) to 4 (inflammation with necrosis), using a double blinded method.

RESULTS

Survival test

No mice survived the infection doses of 2×10^7 after 72 hours, and 2×10^6 CFU/ml after 6 days. After 72 hours, among animals infected with 2×10^5 CFU, survival of ALOX group was 12% and 129WT, 5%. Inoculation of 2×10^4 UFC resulted in 40% of survival for ALOX and 20% for 129WT. with these results the infection dose was defined as 2×10^6 UFC/ml, since at least 72 hours for DL50 (dose lethal for 50%) were necessary for this experiment (Figure 1).



Figures 1: Survival of mice 129WT (figure A) and ALOX (figure B) in different concentrations of inoculums during process of infection.

Bacterial viable counts

No bacterium was detected 6 hours after infection. After 12 hours *Listeria monocytogenes* was detected in blood in both groups, in blood were 3×10^3 CFU/ml (colonies forming unit/milliliter) in ALOX group and $3,4 \times 10^2$ CFU/ml in 129WT. Next samples of blood show a significant increase of *Listeria* for ALOX group with 8×10^5 CFU/ml in 24 and 48 hours after infection, and $2,5 \times 10^4$ CFU/ml, $2,2 \times 10^5$ CFU/ml respectively hours for 129WT group. This show a difference in quantification of *Listeria* find between groups, in ALOX group had a bacteremia with a large number of bacteria than the group of 129WT.

Presence of *L. monocytogenes* was not observed in the first six hours of the infection process. Bacterial count increased in different organs, in ALOX mice, reaching after 48 hours 8×10^5 in blood, $9,7 \times 10^6$ in spleen and 9×10^3 in brain. Numbers of bacteria were lower in 129WT animals during all the process. (Table 1)

Table 1: Number CFU of bacteria in blood, spleen and brain during the infection process.

Hours	Blood (CFU/ml)		Spleen (CFU/g)		Brain (CFU/g)	
	ALOX	129WT	ALOX	129WT	ALOX	129WT
6	0	0	0	0	0	0
12	3×10^3	$3,4 \times 10^2$	0	0	0	0
24	8×10^5	$2,5 \times 10^4$	$6,4 \times 10^3$	$7,3 \times 10^5$	$1,3 \times 10^3$	2×10^2
48	8×10^5	$2,2 \times 10^5$	$9,7 \times 10^6$	$1,2 \times 10^6$	9×10^3	$1,6 \times 10$

Production of nitric oxide

The results show a plasmatic concentration of nitrite in the first 6 hours of $14,3 \mu\text{M}$ and $14,41 \mu\text{M}$ for ALOX and for 129WT groups

respectively, the concentration has a little increase in next controls of 12 and 24 hours, reaching 23 μM and 27,6 μM for ALOX group, and 14,7 μM , 30 μM for 129WT group in respectively time. However after 48 hours of infection a significant increase was observed in the concentration of nitrite in both groups 72, 1 μM for ALOX and 95, 6 μM for 129WT group. The results show a progressive elevation of nitrite in plasma during the evolution of infection in different time for both groups, with a significant increase after 48 hours. Different between the groups was no significant.

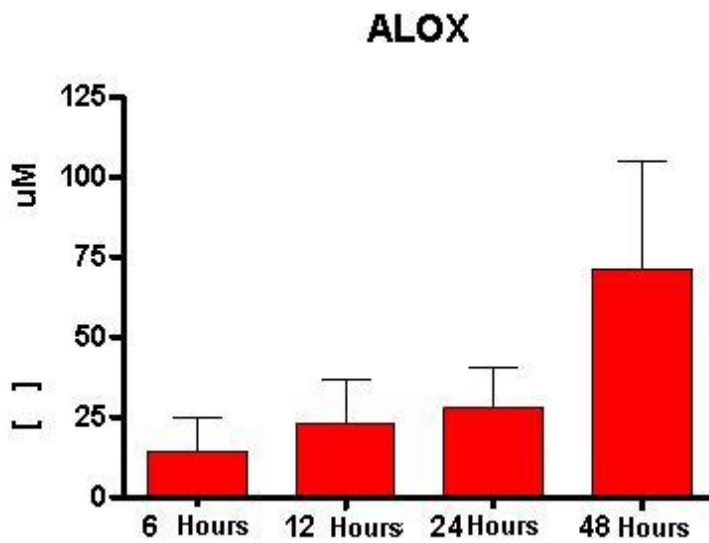


Figure A.

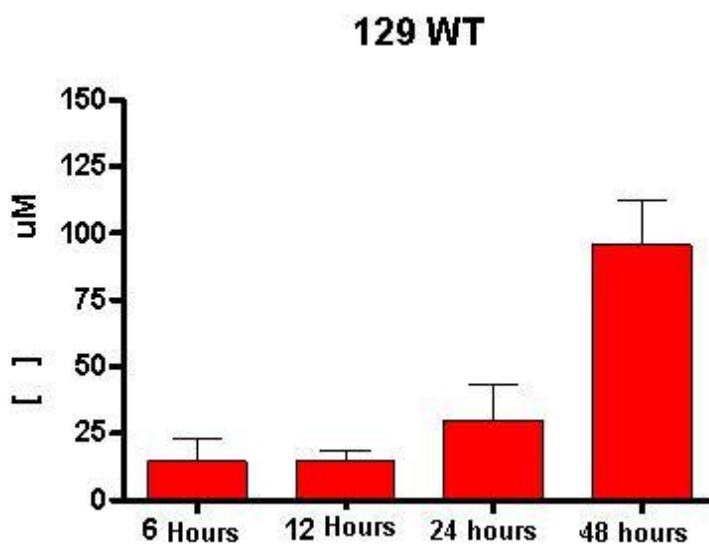


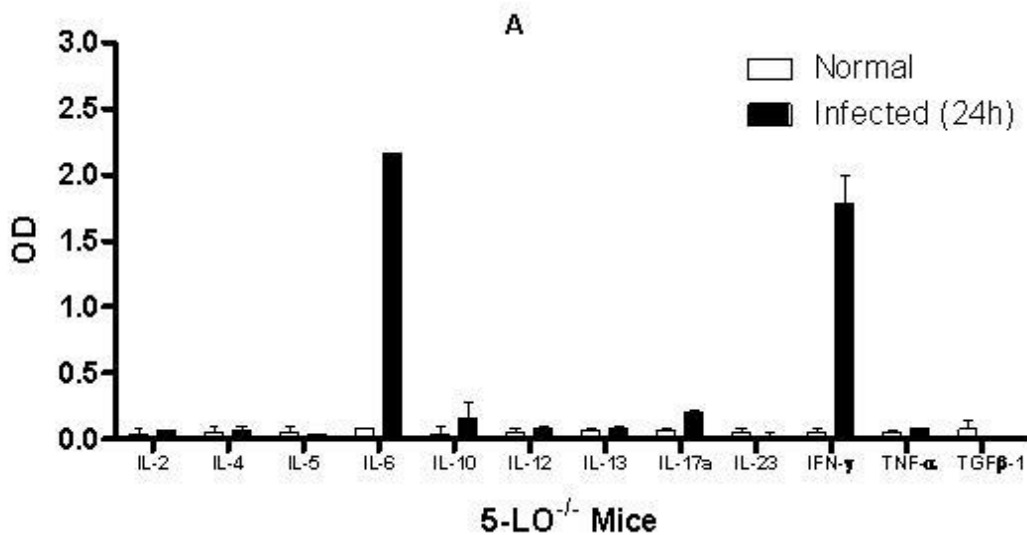
Figure B

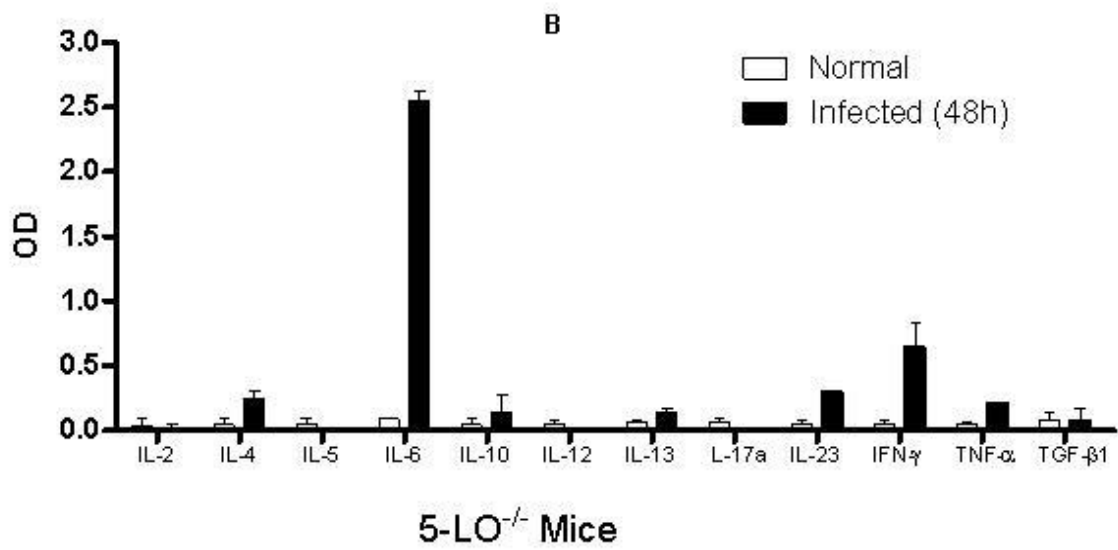
Figures 2: Serum determination of nitrite in mice ALOX (figure A) and 129WT (figure B) in the process of infection.

Determination of plasma cytokines

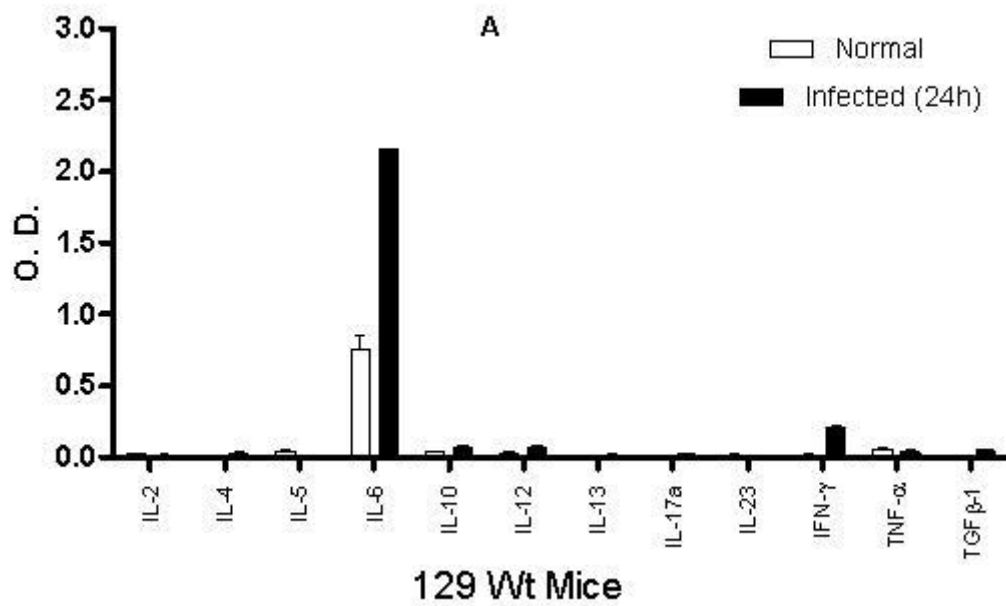
The results show a significant concentration in OD for IL-6, for both groups, in 24 and 48 hours after infection. Others cytokines IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IL-12, IL-13, IL-17A, IL-23, IFN- γ , TNF- α and TGF- β 1, presented show no significant alteration when compared to the animals without infection.

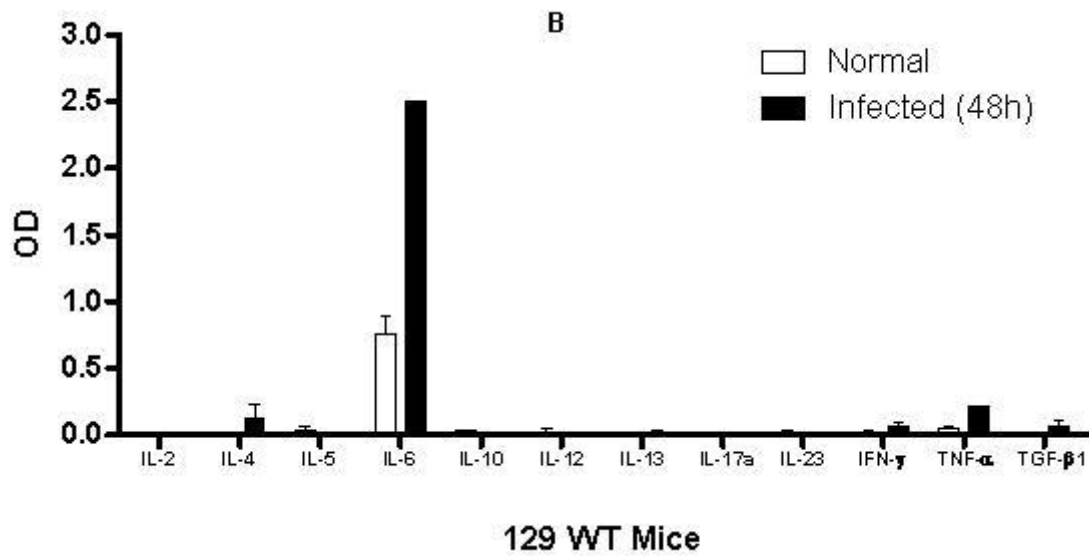
Levels of IFN γ in group ALOX group after 24 hours of infection presented a slight increase, followed by a drop in 48 hours





Figures 3: Determination of interleukins and cytokines in ALOX mice after 24 (figure A) and 48 hours (figure B).





Figures 4: Determination of interleukins and cytokines in 129WT mice after 24 (figure A) and 48 hours (figure B).

Histopathological analysis spleen

The result show a appearance of a progressive lesions within time, accord with the infection, begin with no lesion or little inflammation on 6 hours of infection, to important inflammation with necrosis after 48 hours. No are statistic significant differences to ALOX and 129WT groups.

Table 2: Score of tecidual lesions in spleen

	ALOX		129wt	
	Red	White	Red	White
6h	0,60±0,40	1,20±0,37	1,00±0,44	1,80±0,37
12h	1,00±0,58	1,33±0,33	2,00±0,58	2,00±0,57
24h	1,50±0,50	2,25±0,63	2,25±0,48	3,50±0,29
36h	3,00±0,52	3,17±0,54	4,00±0,00	3,75±0,25

DISCUSSION

The experimental infection in mice has been used for decades to study the immune response, and the use of *L. monocytogenes* infection as a model of intracellular organization had its beginning in the 60's (ZENEWICZ AND SHEN, 2007), being used to study the innate and adaptive immunity in these years.

The natural course of infection by *L. monocytogenes* starts after ingestion of contaminated food. *L. monocytogenes* has the ability to survive the acidity of gastric juices, thus reaches the intestinal tract and uses its receptor specific for human epithelial cells to invade the tissue and reach the circulatory system through the intestinal barrier, using the production of actin fibers to carry out the invasion of adjacent tissues (LECUIT, 2005). Once in the circulatory system it is filtered by the liver and spleen, where they will begin new cell invasion due to their specific receptors to cells of the reticulo-endothelial system (GREGORY AND LIU, 2000).

The innate immune response is necessary to control the initial infection of *L. monocytogenes*, and adaptive response, responsible for clearance of infection, begins to develop from the fifth day after infection (ZENEWICZ, SHEN, H., 2007).

The leukotrienes are synthesized predominantly in cells of myeloid origin through the metabolism of arachidonic acid through 5-lipoxygenase (5-LO) (FUNK and CHEN, 2000). Are formed from a hydroperoxide (5-HPETE) which is converted into LTA₄ with the formation of an epoxide group (oxygen linking the carbons 5 and 6). This is unstable and may undergo enzymatic hydrolysis generating the LTB₄ or receive a residue of glutathione to generate leukotriene C₄ (LTC₄). The withdrawal of the enzyme glutamic acid of LTC₄ and LTD₄ to the origin with the removal of glycine form of LTD₄-LTE₄ if (PETERS-GOLDEN AND HENDERSON, 2007).

The leukotriene B₄ has a capacity of neutrophil chemotaxis, cell adhesion and induction of degranulation and release of lysosomal enzymes from neutrophils. In addition, to role in modulation of immune response through the increased production of IL-6, since the activation of gene

transcription and messenger of IL-6 (HENDERSON, 1994). Thus the leukotrienes increase the capacity of macrophages and neutrophils to eradicate microbes and produce mediators, and its lack leads to a decrease in immune response to bacteria (PETERS-GOLDEN AND HENDERSON, 2007). However listeriolisina leads to poor response of leukotrienes (Sceffer, J. et al, 1988).

In infection by *L. monocytogenes*, in the initial immune response, the macrophages are the main factors (GREGORY AND LIU, 2000). The leukotrienes in turn are shown not to be a crucial factor in the defense against bacteria (HENDERSON, 1994). The ALOX mice due to a deletion in the 5-LO, do not produce leukotrienes, and was used as a model for the study. Previous study with *Listeria* had shown a slight inability to resolve the infection (FUNK, 2000). In the curve of survival however was not significant difference between groups, which is in agreement with the previous study where the absence of leukotriene not changed the mortality.

As leukotriene activity has important chemotaxis (HENDERSON, 1994) was to be expected a change in the immune response against a bacterial infection. This was not observed in this study, perhaps due to *L. monocytogenes* is an intracellular bacterium and its initial immune response of macrophages (GREGORY AND LIU, 2000) depends more than the recruited neutrophils. The macrophages alone are not able to eliminate *L. monocytogenes*, and because the infection starts up the production of inflammatory mediators, which have important action in the defense against *L. monocytogenes* (COUSENS AND WING, 2000). The main inflammatory mediators in the innate immune response against *L. monocytogenes* are tumor necrosis factor alpha (TNF- α), interferon gamma (INF γ), interleukin 1 (IL-1) and interleukin 6 (IL-6) these mediators, in addition to being the first to be secreted during the bacterial infection, still have a strong connection between them (LIU ET AL, 1995). Studies have shown the importance of TNF, because in the absence of TNF in innate immune response cannot control the infection by *L. monocytogenes* (VIRNA ET AL, 2006), and administration of anti-TNF in mice are sublethal infection of *L. monocytogenes* become lethal to animals. TNF alters the recruitment of leukocytes in vivo, prioritizes oxidative activity

for neutrophils and activates macrophages (LIU ET AL, 1995). One of the factors by which the lack of TNF reduces the control of infection by *L. monocytogenes* is a reduced expression of iNOS (inducible nitric oxide synthase) (VIRNA ET AL, 2006). The IL-12 and TNF- α act in synergy leading to production of INF γ (COUSENS AND WING, 2000). The INF- γ in turn increases the response of macrophages to *L. monocytogenes* inhibiting its growth, there is still controversy on how to stimulate the macrophage INF γ (COUSENS AND WING, 2000). Mice deficient in INF γ are more susceptible to infection by *L. monocytogenes*. However has a minor role in reinfection (ZENEWICZ AND SHEN, 2007). The IL-1, although not measured in this methodology has important it increases the activation of T cells and is involved in chemotaxis of neutrophils, but is not present in the peripheral circulation during *Listeria* infection in mice (LIU ET AL, 1995). IL-1 has been shown to be a potential inducer of IL-6. Anti-IL-6 administered during infection by *L. monocytogenes*, inhibits the protective effect caused by administration of recombinant IL-1 in mice, suggesting that the protective effect of IL-1 requires the presence of IL-6 (LIU ET AL, 1995). The IL-6 is the primary cytokine in the immune response to infection by *L. monocytogenes* during the acute response. Its main source of synthesis is the Kupffer cells in liver (GREGORY ET AL, 1998). Serum levels of IL-6 are correlated with the amount of bacteria (LIU ET AL, 1995). Also mice with deficiency in IL-6 are more susceptible to infection by *L. monocytogenes* genes (COUSENS AND WING, 2000). The result showed that only the presence of IL-6 determination in serum was high, and no difference between groups and ALOX 129WT, this result can be explained by the production of cytokines was restricted to the infection site, as other studies have proved the production of tissue TNF- α , IL-1 and INF γ (WAY AND WILSON, 2004). At 24 hours INF γ was detected in ALOX group, but no in 129WT, this can be a different response of immune system in absence of leukotrienes. IL-6 serum level reached to be detected by the methodology used. Again there was no difference between groups ALOX and 129WT and despite the leukotriene B4 is an inducer of IL-6 in macrophages (HENDERSON, 1994), in this case its

absence was not significant to change its concentration and thus the course of infection

In the spleen the expression of mRNA for TNF- α and INF γ and are induced to the maximum on the first day of infection. The mRNA for iNOS appears after (BOOKVAR ET AL, 1994). Whereas the synthesis of an active enzyme requires several cofactors and conversion of NO is achieved via several means of nitrate, the peak of NO synthesis usually occurs between 2 to 5 days of infection (SPRONG ET AL, 2000). As the macrophages of the liver and spleen as source of nitrate excretion in primary infection of *L. monocytogenes* (MACFARLANE, 1998). The inhibition of NO production in mice infected with *L. monocytogenes* showed exacerbation of infection (BOOKVAR ET AL, 1994). The result obtained in this study shows the gradual increase of serum nitrite during the course of infection, with an increase of three times the value of strength in 48 hours, which confirms the results of Bookvar et al, 1994. However no significant difference between groups, this finding shows that leukotrienes probably do not influence the production of NO during infection by *L. monocytogenes*.

The differences between the lesions found in the spleen tissue pathological study were not significant between groups, confirming the findings of inflammatory response and mortality previously discussed. Again the lack of leukotrienes was not significant for infection by *L. monocytogenes*.

Despite all these results show no significant differences of the lack of leukotrienes in the course of infection of *L. monocytogenes*, the result of the counting of viable bacteria in blood, spleen and brain showed significant differences between groups ALOX and 129WT, and the amount of bacteria found in the group ALOX than media of bacteria recovered in their control, suggesting that despite the lack of leukotrienes do not change the outcome in acute infection by *L. monocytogenes*, a reduction in the ability to resolve the infection in ALOX group, suggesting that the lack of leukotriene modifying the immune response against the infection by *L. monocytogenes*, but in testing there was no significant difference to justify such a finding, deeper studies are needed using other routes of immune response to discover the cause of this difference.

The full knowledge of the role of leukotrienes in the immune response is yet to be discovered, for this more studies will be necessary.

REFERENCES

BERCHE, PATRICK, Bacteremia is required for invasion of the murine central nervous system by *Listeria monocytogenes*, *Microbial Pathogenesis*, 18: 323-336, 1995.

BOOKVAR, KENNETH S. ET AL; Nitric Oxid Produced during Murine Listeriosis is Protective; *Infection and Immunity*; 62: 1089-1100; 1994.

COUSENS, LESLIE P. E WING, EDWARD J., Innate defenses in the liver during *Listeria* infection; *Immunological Reviews*; Vol. 174; 150-159; 2000.

DRAMSI, S. ET AL, Entry of *Listeria monocytogenes* into neurons occurs by cell-to-cell spread: an in vitro study, *Infection and immunity*, 66: 4461-4468, 1998.

DREVETS, D. A. ET AL, Invasion of the central nervous system by intracellular bacteria, *Clinical Microbiology Reviews*, 17: 323-347, 2004.

DUSSURGET, O.; PIZARRO-CERDA, J. AND COSSART, P., Molecular determinants of *Listeria monocytogenes* virulence, *Annu. Rev. Microbiol*, 58:587-610, 2004.

FUNK, COLIN D. E CHEN, XIN-SHENG; 5-Lipoxygenase and Leukotrienes: Transgenic Mouse and Nuclear Targeting Studies; *Am J Respir Crit Care Med*; 161: 120-124; 2000.

GRAY, MICHAEL J., FREITAG, NANCY E. AND BOOR, KATHRYN J., How the Bacterial Pathogen *Listeria monocytogenes* Mediates the Switch from Environmental Dr. Jekyll to Pathogenic Mr. Hyde, *Infection and Immunity*, 74: 2505-2512, 2006.

GREGORY, STEPHEN H. E LIU, CHAU-CHING; CD8+ T-cell-mediated response to *Listeria monocytogenes* taken up in the liver and replicating within hepatocytes; *Immunological Reviews*; 174: 112-122; 2000.

GREGORY, STEPHEN H. ET AL; IL-6 Produced by Kupffer Cells Induces STAT Protein Activation in Hepatocytes Early During the Course of Systemic Listerial Infections; *The Journal of Immunology*; 160: 6056-6061; 1998.

GRIESS, J. P. Bemerkungen zu der abhandlung der H.H. Weselsky und Benedikt "ueber einige azoverbindugen". *Chem. Ber.*, 12: 426-428, 1879.

HENDERSON, WILLIAM R.; The Role of Leukotrienes in Inflammation; *Annals of Internal Medicine*; 121: 684-697; 1994.

LARA-TEJERO, MARIA E PAMER, ERIC G.; T cell responses to *Listeria monocytogenes*; *Current opinion in Microbiology*; 7: 45-50; 2004.

LECUIT, M.; Understanding how *Listeria monocytogenes* targets and crosses host barriers; *Clin Microbiol Infect*; 11: 430-436; 2005.

LIU, D.; Chapter 2: Epidemiology; in: _____; *Handbook of Listeria monocytogenes*; 1 ed.; New York, US; p. 27-61; 2008.

LIU, Z., SIMPSON, R. J. E CHEERS, C.; Interaction of interleukin-6, tumour necrosis factor and interleukin-1 during *Listeria* infection; *Immunology*, 85; 562-567; 1995.

MACFARLANE, A. S. ET AL, *Microbial pathogenesis*, 25: 267-277, 1998.

MARQUIS, HELENE; GOLDFINE, HOWARD AND PORTNOY, DANIEL A.; Proteolytic Pathways of activation and degradation of a bacterial phospholipase C during intracellular infection by *Listeria monocytogenes*, *The Journal of Cell Biology*, 137: 1381-1392, 1997.

NAVARRO-GONZÁLVEZ, J. A.; GARCÍA-BENAYAS, C.; ARENAS, J. Semiautomated measurement of nitrate in biological fluids. *Clin. Chem.*, 44 (3):670-681, 1998.

PETERS-GOLDEN, MARC E HENDERSON JR., WILLIAM R.; Mechanisms of disease: Leukotrienes; *The New England Journal of Medicine*; 357: 1841-54; 2007.

SCHEFFER, J. ET al; Comparison of Four Hemolysin-Producing Organisms (*Escherichia coli*, *Serratia marcescens*, *Aeromonas hydrophila* and *Listeria monocytogenes*) for Release of Inflammatory Mediators from Variou Cells; *Journal of Clinical Microbiology*; 26: 544-551; 1988.

SEELIGER, H.P.R., and Langer, B., Serological analysis of the genus *Listeria*. Its values and limitations, *Int. J. Food Microbiol.*, 8, 245, 1989.

SIBELIUS, ULF ET AL, Pole of *Listeria monocytogenes* Exotoxins Listeriolysin and Phosphatidylinositol-Specific Phospholipase C in Activation of human Neutrophils, *Infection and Immunity*, 67: 1125-1130, 1999.

SOUTHWICK, FREDERICK S. E PURICH, DANIEL L.; Mechanisms of Disease: Intracellular Pathogenesis of Listeriosis; *The new England Journal of Medicine*; 334 12: 770-776; 1996.

SPRONG, R. C. ET AL, Quantifying translocation of *Listeria monocytogenes* in rats by using urinary nitric oxide-derived metabolites, *Applied and Environmental microbiology*, 66: 5301-5305, 2000.

SOKOLOVIC, Z. ET AL, Differences in virulence and expression of PrfA and PrfA-regulated virulence genes of *Listeria monocytogenes* strains belonging to serogroup 4, *Infection and immunity*, 64:4008-4019, 1996.

TORRES, DAVID ET AL; Toll-Like Receptor 2 Is Required for Optimal Control of *Listeria monocytogenes* Infection; *Infection and Immunity*; 72: 2131-2139; 2004.

VÁZQUEZ-BOLAND, JOSÉ A. ET AL, *Listeria* Pathogenesis and Molecular Virulence Determinants, *Clinical Microbiology Reviews*, 14: 584-640, 2001.

VIRNA, SIMONA ET AL; TNF is Important for Pathogen Control and Limits Brain Damage in Murine Cerebral Listeriosis; *The Journal of Immunology*; 177: 3972-3984; 2006.

WAY, SING SING AND WILSON, CHRISTOPHER B., Cutting edge: Immunity and INF- γ production during *Listeria monocytogenes* infection in the absence of T-bet, *The Journal of Immunology*, 173:5918-5922, 2004.

ZENEWICS, LAURE A. E SHEN, HAO; Innate and adaptive immune responses to *Listeria monocytogenes*: a short overview; *Microbes and infection*, xx; 1-8 (in press), 2007.