



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA  
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

**AÇÃO *in vitro* DA NEUWIEDASE SOBRE A INFECÇÃO POR *T. gondii* EM FIBROBLASTOS HUMANOS E NA PRODUÇÃO DE MEDIADORES INFLAMATÓRIOS POR CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE PERIFÉRICO HUMANO**

Luciana Machado Bastos

**Orientador:** Profa. Dra. Amélia Hamaguchi

**Co-Orientador:** Profa. Dra. Veridiana de Melo Rodrigues Ávila

Uberlândia - MG

Janeiro – 2008



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA  
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

**AÇÃO *in vitro* DA NEUWIEDASE SOBRE A INFECÇÃO POR *T. gondii* EM FIBROBLASTOS HUMANOS E NA PRODUÇÃO DE MEDIADORES INFLAMATÓRIOS POR CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE PERIFÉRICO HUMANO**

Luciana Machado Bastos

**Orientador:** Profa. Dra. Amélia Hamaguchi

**Co-Orientador:** Profa. Dra. Veridiana de Melo Rodrigues Ávila

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Uberlândia como parte dos requisitos à obtenção do título de Mestre em Genética e Bioquímica (Área Bioquímica).

Uberlândia - MG  
Janeiro - 2008

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

---

B327a Bastos, Luciana Machado, 1978-  
Ação in vitro da neuwiedase sobre a infecção por *T. gondii* em fibroblastos humanos e na produção de mediadores inflamatórios por células mononucleares do sangue periférico humano / Luciana Machado Bastos. - 2008.

101 f. : il.

Orientadora: Amélia Hamaguchi.

Co-orientadora: Veridiana de Melo Rodrigues Ávila

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica.

Inclui bibliografia.

1. Cobra venenosa - Veneno - Teses. 2. Brothrops - Teses. I. Hamaguchi, Amélia. II. Ávila, Veridiana de Melo Rodrigues. III. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica. IV. Título.

CDU: 615.919:598.126

---

Elaborado pelo Sistema de Bibliotecas da UFU / Setor de Catalogação e Classificação



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA  
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

**AÇÃO *in vitro* DA NEUWIEDASE SOBRE A INFECÇÃO POR *T. gondii* EM FIBROBLASTOS HUMANOS E NA PRODUÇÃO DE MEDIADORES INFLAMATÓRIOS POR CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE PERIFÉRICO HUMANO**

ALUNO: Luciana Machado Bastos

**COMISSÃO EXAMINADORA**

Presidente: \_\_\_\_\_

Profa. Dra. Amélia Hamaguchi

Examinadores : \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Data da Defesa: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

As sugestões da Comissão Examinadora e as Normas PGGB para o formato da Dissertação foram contempladas

\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Amélia Hamaguchi

*“A persistência é o caminho do êxito”*

*Charles Chaplin*

## **Dedicatória**

Dedico este trabalho especialmente ao meu pai, Paulo e à minha mãe, Leila, responsáveis por tudo que sou hoje, inclusive por essa conquista e que sempre me estimularam sem nunca poupar esforços para que eu realizasse meus sonhos. Sou privilegiada por tê-los ao meu lado, sempre tão presentes e dedicados e como exemplo de persistência e honestidade. Pelo amor, segurança e apoio em todos os momentos de minha vida, minha eterna gratidão.

À minha irmã Paula, quem sempre confiou profundamente em minha capacidade e torceu com muito orgulho por mim. Agradeço por tudo, pelos momentos de incentivo, carinho e amizade profunda.

Ao Gianni, meu amor, que fez dele esse meu sonho, que participou dos momentos difíceis com palavras e gestos de carinho e incentivo, com paciência e bom humor.

# Agradecimentos

- ❖ A Deus e Nossa Senhora por iluminarem todos os meus passos, dando-me saúde e capacidade para chegar a essa conquista.
- ❖ À professora Dra. Amélia Hamaguchi pela oportunidade e confiança a mim depositada, muito obrigada.
- ❖ À professora Dra. Veridiana de Melo Rodrigues Ávila pelas orientações, atenção e incentivo. E claro, pela sua amizade desde o começo.
- ❖ À Dra. Deise Aparecida Oliveira Silva, pela sua imensurável contribuição a este trabalho, sempre com muita boa vontade e competência.
- ❖ Ao professor Dr. José Roberto Mineo, a quem sou muito grata por ter oferecido seu laboratório e seu precioso conhecimento em função deste trabalho.
- ❖ À professora Dra. Maria Inês Homsí- Brandeburgo, por estar sempre elogiando e incentivando o progresso de seus alunos com palavras confortantes e estimulantes, inclusive a mim.
- ❖ Ao meu querido amigo Robson José de Oliveira Júnior, que muito contribuiu com seu amplo conhecimento científico. Agradeço não só pelo auxílio nos experimentos, mas pela dedicação, amizade e grande

**empenho que você teve neste trabalho. A minha admiração por você não cabe em palavras.**

- ❖ Ao meu querido e eterno amigo Fábio Lucas Silva Costa, por tudo que me ensinou e contribui para minha evolução como pesquisadora e pela verdadeira e sincera amizade hoje e sempre.**
- ❖ À minha amiga Mirian Machado Mendes, quem sempre confiou e torceu por mim, agradeço por sempre estar disposta em me ajudar e a me ver crescer. Sua “veia” pesquisadora e sua amizade me incentivaram muito.**
- ❖ Às minhas amigas Renata e Johara, pela receptividade com que me receberam, companheirismo e torcida sincera.**
- ❖ Ao meu amigo querido Luiz Fernando Moreira Izidoro, a quem admiro e gosto muito. Agradeço por saber que sempre posso contar com você, pela sua amizade, admiração e confiança em mim.**
- ❖ Ao meu amigo Luiz Carlos de Paula Gebrim, quem muito contribui com idéias, palavras de apoio e bom humor.**
- ❖ Ao meu amigo Carlos Ueira Vieira, a quem tenho muito a agradecer por sua imensa contribuição para a realização deste trabalho.**
- ❖ Ao professor Dr. David Nascimento Silva Teixeira e a toda sua equipe da UFTM pela receptividade, orientações e disposição em ajudar.**
- ❖ À Taísa Oliveira Carrijo pela ajuda não só na condução dos experimentos, mas na elaboração e interpretação dos resultados. Obrigada, amiga.**
- ❖ À Dayane pela sua disposição em ajudar sempre que precisei.**



- ❖ **Ao Dâmaso, que sempre contribui com a maior boa vontade e bom humor.**
- ❖ **À Tianinha, pelo carinho com que cuida de nós, por estar sempre presente quando precisamos e por sua ajuda e torcida por nossa vitória**
- ❖ **À Dona Nilma pela compreensão e afeição durante todo nosso convívio e realização desse trabalho. Você é uma pessoa admirável a quem tenho muito respeito e carinho.**
- ❖ **Aos funcionários Cleuber, Dona Nenzinha e Gérson.**
- ❖ **Ao amigo Mário Sérgio Rocha Gomes, quem sempre torceu por mim.**
- ❖ **Aos colegas do laboratório Leonardo, Luis Henrique, Beto, Débora, Sâmela, Malson, Jordano, Letícia, Daiana e Carolina, pelo agradável convívio.**
- ❖ **Ao ensino público, gratuito e de qualidade.**

# Sumário

<b>Apresentação</b>	<b>1</b>
<b>Capítulo 1</b>	<b>4</b>
1.1 Introdução Geral	5
1.1.1 Peçonhas de serpente	5
1.1.2 Neuwiedase	10
1.1.3 Aplicações terapêuticas	11
1.2 Toxoplasmose	13
1.2.1 Ciclo de vida do parasita	15
1.2.2 <i>Toxoplasma gondii</i> ; morfologia e mecanismos de invasão	20
1.2.3 Terapia recorrente	26
1.3 Referências bibliográficas	27
<b>Capítulo 2</b>	<b>46</b>
2.1 Introdução	49
2.2 Materiais e métodos	52
2.2.1 Reagentes	52
2.2.2 Cultura de células	52
2.2.3 Parasitas	52
2.2.4 Ensaio de citotoxicidade	53
2.2.5 Efeitos da neuwiedase sobre <i>T. gondii in vitro</i>	54
2.2.6 Determinação da produção de citocinas e quimiocinas	55
2.2.7 Análise estatística	55
2.3 Resultados	56
2.3.1 Atividade citotóxica de neuwiedase sobre fibroblastos humanos	56
2.3.2 Tratamento com neuwiedase de fibroblastos humanos previamente infectados com <i>T. gondii</i>	56
2.3.3 Pré-tratamento de taquizoítos de <i>T. gondii</i> com neuwiedase antes da infecção de fibroblastos humanos	56

2.3.4 Cálculos da dose inibitória de 50 % (DI <sub>50</sub> ) e Índice terapêutico (IT)	57
2.3.5 Determinação da produção de citocinas e quimiocinas	57
2.4 Discussão	57
2.5 Agradecimentos	62
2.6 Referências	62
<b>Capítulo 3</b>	<b>75</b>
3.1 Introdução	78
3.2 Materiais e métodos	80
3.2.1 Obtenção da neuwiedase	80
3.2.2 Eletroforese em gel de poliacrilamida com agentes desnaturantes	81
3.2.3 Obtenção e cultivo de células monucleares do sangue periférico	82
3.2.4 Viabilidade celular	83
3.2.5 Estímulo com neuwiedase	84
3.2.6 Dosagem de citocinas e quimiocinas por Elisa (“Enzime Linked Immunosorbent Assay”)	84
3.2.7 Análise estatística	84
3.3 Resultados	85
3.3.1 Purificação da neuwiedase	85
3.3.2 Viabilidade celular	85
3.3.3 Efeitos da neuwiedase na produção de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias	85
3.4 Discussão	86
3.5 Agradecimentos	88
3.6 Referências	89

# Lista de Figuras

## Capítulo 1

Figura 1. Estruturas esquemáticas das metaloproteases de peçonhas de serpentes	8
Figura 2. Modelo molecular da neuwiedase	10
Figura 3. Diagrama do ciclo de vida do <i>Toxoplasma gondii</i> segundo BLACK e BOOTHROYD, 2000	17
Figura 4. Principais rotas de infecção segundo TENTER et al., 2000	18
Figura 5. Morfologia e organelas do <i>T. gondii</i> em seu estágio taquizoíto segundo BLACK e BOOTHROYD, 2000	21
Figura 6. Os sete passos de invasão do <i>Toxoplasma</i> , segundo CARRUTHERS e BOOTHROYD, 2007	23

## Capítulo 2

Figura 1. Atividade citotóxica da neuwiedase <i>in vitro</i> determinada por ensaios de MTT	67
Figura 2. Efeitos do tratamento com neuwiedase quanto à inibição da invasão	68
Figura 3. Efeitos do tratamento com neuwiedase quanto à inibição da multiplicação intracelular	69

Figura 4. Fotomicrografia de fibroblastos infectados com <i>T. gondii</i> e fibroblastos não infectados	72
---	----

Figura 5. Produção de IL-8 por fibroblastos humanos (HFF) previamente infectados com <i>T. gondii</i> e tratados com neuwiedase	73
---	----

### **Capítulo 3**

Figura 1. Perfil cromatográfico de peçonha bruta de <i>Bothrops pauloensis</i> em resina de troca iônica CM-Sepharose	93
---	----

Figura 2. Perfil cromatográfico da fração CM2 em resina de interação hidrofóbica Phenyl-Sepharose CL-4B	94
---	----

Figura 3. Gel de SDS-PAGE corado com prata, evidenciando a pureza da neuwiedase pela presença de banda única	95
--	----

Figura 4. Viabilidade celular das PBMC sob estímulo de neuwiedase <i>in vitro</i> determinada por ensaios de MTT	96
--	----

Figura 5. Produção de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias por células mononucleares do sangue periférico (PBMC) sob estímulo de neuwiedase	97
--	----

Figura 6. Produção de citocina antiinflamatória IL-10 por células mononucleares do sangue periférico (PBMC) sob estímulo de neuwiedase	100
--	-----

# Lista de Tabelas

**Tabela 1.** Inibição *in vitro* da infecção por *Toxoplasma gondii* em fibroblastos humanos sob diferentes condições de tratamento com a toxina Neuwiedase isolada da peçonha da serpente *Bothrops pauloensis*. 74

# Lista de Abreviaturas

**AIDS:** síndrome da imunodeficiência adquirida (acquired immunodeficiency syndrome)

**EDTA:** etilenodiaminotetraacético

**ELISA:** “Enzyme Linked Immunosorbent Assay”

**HFF:** Human foreskin fibroblast

**MTT:** methyl thiazolyl tetrazolium

**NEW:** Neuwiedase

**PBMC:** células mononucleares do sangue periférico (“peripheral blood mononuclear cells”)

**PBS:** tampão salina fosfatada (“phosphate-buffered saline”)

**PLA<sub>2</sub>:** Fosfolipase A<sub>2</sub>

**SNC:** Sistema Nervoso Central

**SVMP:** metaloproteases de peçonhas de serpente (“Snake venom metalloproteases”)

**SVSP:** serinoproteases de peçonhas de serpente (“Snake venoms serinoproteases”)

**TAME:** tosyl-L-Arg-methyl Ester

***T. gondii*** : *Toxoplasma gondii*

# **Apresentação**



As toxinas animais constituem uma preciosa fonte de compostos ativos, especialmente as toxinas de serpente. Um melhor conhecimento a respeito das peçonhas de serpente, seus componentes, efeitos e aplicações atraem o interesse de indústrias farmacêuticas. Uma vasta extensão de atividades farmacológicas já foi descrita para essas substâncias. As proteases presentes nessas peçonhas despertam atenção especial por possuírem atividades relacionadas ao quadro de envenenamento, afetando diversos processos metabólicos essenciais e por isso serem alvo de investigação na descoberta ou desenvolvimento de novos agentes terapêuticos.

A neuwiedase é uma metaloprotease purificada a partir da peçonha de *Bothrops pauloensis*, serpente conhecida popularmente como jararaca-pintada. A neuwiedase apresenta atividade hidrolítica sobre o fibrinogênio, a fibrina e sobre componentes da matriz extracelular como laminina, nidogênio e colágeno tipo IV.

A toxoplasmose é uma doença de prevalência mundial provocada por um protozoário intracelular obrigatório, o *Toxoplasma gondii*. As manifestações mais graves dessa doença são observadas na infecção congênita, onde a mãe contaminada durante a gestação pode transmitir o parasita ao feto e na infecção em indivíduos imunocomprometidos. Na primeira condição, o feto pode apresentar danos incompatíveis com a vida, culminado em aborto ou pode levar ao nascimento de crianças com deficiências mentais e visuais, em diferentes graus. Quanto à infecção em imunodeprimidos, sabe-se hoje que a toxoplasmose está entre as principais causas de morte entre pacientes aids. O presente trabalho buscou avaliar os efeitos da neuwiedase sobre a invasão e proliferação do *Toxoplasma gondii* em cultura celular de fibroblastos humanos e sobre o perfil de citocinas produzidas por essas células nessas condições. O estímulo da neuwiedase na produção de citocinas inflamatórias e antiinflamatórias por células mononucleares do sangue periférico de humanos *in vitro* também foi investigado.

A apresentação deste trabalho foi realizada segundo as normas da Pós-Graduação em Genética e Bioquímica. O trabalho foi dividido em três capítulos, como explicado a seguir: **Capítulo 1-** Introdução ou revisão bibliográfica sobre todos os temas abordados no trabalho, como composição de peçonhas de serpentes e suas aplicações terapêuticas; estrutura, classificação e atividades da neuwiedase; *Toxoplasma gondii*, transmissão, prevalência e manifestações

clínicas da toxoplasmose; resposta imune e mecanismos de invasão do parasita e uma breve revisão sobre as funções das células mononucleares do sangue periférico. **Capítulo 2**- Efeitos da neuwiedase, uma metaloprotease de peçonha de serpente, sobre a invasão e proliferação de *Toxoplasma gondii* em fibroblastos humanos (escrito sob forma de artigo que será submetido para publicação na revista Experimental Parasitology). **Capítulo 3**- Neuwiedase estimula produção de citocinas e quimiocinas inflamatórias por células mononucleares do sangue periférico humano, *in vitro*. (capítulo escrito sob a forma de artigo que será submetido para publicação na revista Toxicon).

# Capítulo 1

# 1. Introdução Geral

## 1.1.1 Peçonhas de serpente

Desde tempos remotos, as serpentes provocam interesse, curiosidade e analogias em muitas extensões da vida humana, inspirando símbolos nas religiões (a maldade e o pecado original), nas ciências (símbolos da farmácia e medicina) e outros (RAMOS e SELISTRE-DE-ARAÚJO, 2006).

As serpentes são classificadas em peçonhentas e não peçonhentas. As primeiras são aquelas providas de glândulas onde produzem e armazenam a peçonha, bem como dentes inoculadores localizados geralmente na região anterior do maxilar superior e as serpentes não-peçonhentas são desprovidas desse aparato produtor e inoculador de peçonha (CARDOSO, 2003).

As espécies de serpentes peçonhentas brasileiras estão reunidas principalmente em duas famílias, Elapidae (gênero *Micrurus*) e Viperidae (gêneros *Bothrops*, *Crotalus* e *Lachesis*). Com algumas exceções, serpentes da família Viperidae (subfamílias Viperinae e Crotalinae) induzem envenenamentos caracterizados por hemorragia, em adição ao excesso de manifestações patofisiológicas, as quais podem incluir necrose local, bolha, edema e efeitos sistêmicos como coagulopatia, nefrotoxicidade, alterações hemodinâmicas e, em alguns casos, cardiotoxicidade e neurotoxicidade (WARREL, 1995,1996; GUTIÉRREZ et al., 2005).

As peçonhas de serpentes consistem de uma complexa mistura de proteínas (mais que 90% de seu peso seco), compostos orgânicos com baixo peso molecular e compostos inorgânicos (RAMOS e SELISTRE-DE-ARAÚJO, 2006). Dentre as proteínas, grande parte são enzimas, como as fosfolipases A<sub>2</sub>, L-aminoácido oxidases (LAO), hialuronidases e as proteases.

As proteases de peçonhas documentadas bioquimicamente podem ser classificadas dentro de dois grupos: serinoproteases e metaloproteases (JAGADEESHA et al., 2002).

As serinoproteases pertencem a uma grande família de peptidases que possuem estrutura e especificidade semelhante à tripsina (conhecida como Tripsina S1), entretanto, apesar da similaridade elas freqüentemente atuam em substratos

macromoleculares específicos. Essas toxinas são caracterizadas e definidas por um mecanismo catalítico comum que inclui uma alta reatividade de um resíduo serina, o qual possui função crítica durante a catálise (SERRANO & MAROUN, 2005).

Serinoproteases de peçonhas de serpentes (SVSPs) são enzimas conhecidas por afetarem o sistema hemostático de mamíferos. Em geral, SVSPs interferem na hemostasia de duas formas: a) ativando especificamente componentes do sangue envolvidos na coagulação, fibrinólise e agregação plaquetária ou b) inibindo essas vias por degradação proteolítica (BRAUD et al., 2000). Portanto, podem possuir atividades com efeitos procoagulantes ou anticoagulantes (MARKLAND, 1998). Desta forma, SVSPs são classificadas em vários grupos tais como: enzimas com atividade coagulante sobre o fibrinogênio, enzimas fibrino(geno)líticas, ativadores de plasminogênio, ativadores de protrombina, ativadores de fator V e X e inibidores ou ativadores da agregação plaquetária (MARKLAND, 1998).

As SVSPs fibrinogenolíticas são freqüentemente referidas como enzimas “thrombin-like” por possuírem a habilidade em clivar o fibrinogênio de forma semelhante à trombina, liberando fibrinopeptídeos A, fibrinopeptídeos B ou ambos (CASTRO et al., 2004).

Em 1963 foi descoberto que algumas proteases de peçonhas de serpente eram inibidas por EDTA (SATAKE et al., 1963) e por isso indicava-se a presença de metaloproteases nessas peçonhas. O EDTA é um agente quelante, ou seja, ele é capaz de atrair o íon metálico essencial para a atividade desse grupo de enzimas. É atualmente sabido que as metaloproteases de peçonhas de serpente são, na realidade, as toxinas fundamentais envolvidas na patogênese induzida no envenenamento (FOX e SERRANO, 2005).

Essas enzimas são em geral zinco-dependentes e a maioria delas, denominadas zincinas, possuem uma seqüência consenso, HEXXH (onde H representa o aminoácido histidina, X um aminoácido qualquer e E o aminoácido ácido glutâmico), com as duas histidinas agindo como ligantes ao zinco catalítico (GOMIS-RÜTH, 2003). As zincinas são subdivididas em gluzincinas, aspzincinas e metzincinas, de acordo com o tipo de aminoácido que participa como resíduo ligante de zinco.

Uma conservada região metal-ligante com três histidinas e uma glicina caracteriza um importante grupo de metaloproteases pertencentes ao clã Metaloproteases A (MA), também conhecido como metzincinas (QUIÑONES et al., 2006).

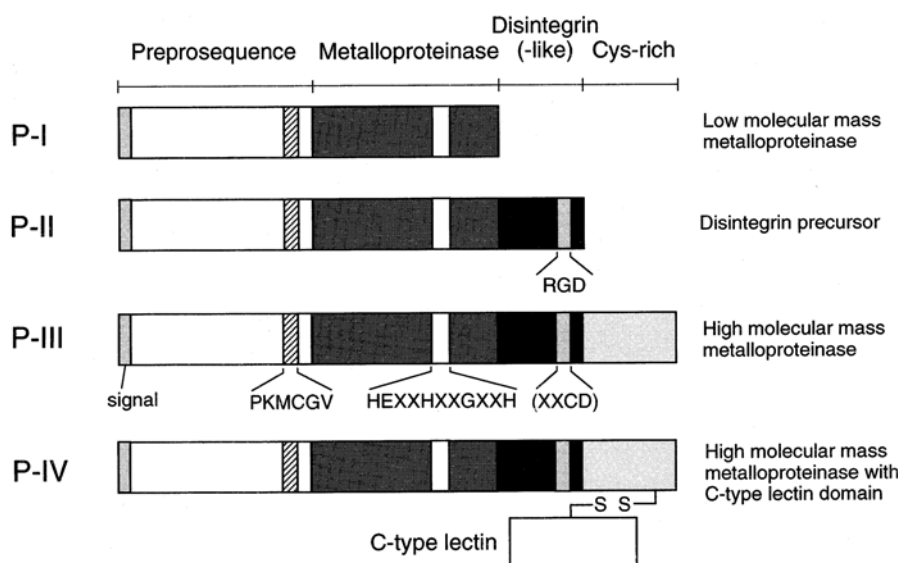
Essas enzimas possuem “Met-Turn”, uma conservada sequência contendo um resíduo de metionina que serve como uma base hidrofóbica. Durante o processo catalítico, o ácido L:glutâmico (E) transfere átomos de H e polariza a molécula de água ligada ao zinco, promovendo ataque nucleofílico à ligação peptídica do substrato a ser hidrolisada (GOMIS-RÜTH, 2003).

Reprolisinas são parte da família “metzincinas” de metaloproteases zinco-dependentes, com a seqüência consenso HEXXHXXGXXH e a presença do giro de metionina (BODE et al., 1993; GUTIÉRREZ e RUCAVADO, 2000).

Membros da subfamília reprolisinas, também conhecidas como adamalinas, foram inicialmente caracterizadas a partir de venenos hemorrágicos e não hemorrágicos de répteis, as metaloproteases de peçonhas de serpentes (SVMP). A hemorragia pós-envenenamento foi primeiramente atribuída à habilidade das SVMP em digerir componentes da matriz extracelular circunjacentes aos capilares, como colágeno tipo IV, nidogênio, fibrobectina, laminina e gelatina. Isso resulta na necrose tecidual e é exacerbada pelas desintegrinas (GOMIS-RÜTH, 2003). Desintegrinas são polipeptídeos presentes nas peçonhas de serpentes capazes de inibir a agregação plaquetária por ligarem à glicoproteína IIb-IIIa, o receptor de fibrinogênio na membrana plaquetária (MARKLAND, 1998).

O termo reprolisina foi criado em 1995 para se referir a uma subfamília da família M12 de metaloproteases que compreende as metaloproteases de peçonhas de serpente (SVMPs) e ADAMs (um domínio desintegrina e um domínio metaloprotease), as quais compartilham minimamente domínios metaloproteases homólogos, mas em muitas ocasiões também compartilham domínios homólogos carboxi para domínios proteases (BJARNASON e FOX, 1995; FOX e LONG, 1998; FOX e SERRANO, 2005). ADAMs são proteínas com multidomínios que incluem domínios metaloproteases e domínios “desintegrin-like”, as quais combinam característica de moléculas de adesão e de proteases (WOLFSBERG et al., 1995).

As metaloproteases apresentam massas moleculares entre 20 a 100 kDa e são classificadas em 4 grupos estruturalmente distintas: P-I (aquelas que possuem somente o domínio metaloprotease); P-II (sendo aquelas com o domínio metaloprotease e o domínio desintegrina); P-III (as sintetizadas com domínio metaloprotease, domínio “desintegrin-like” e um domínio rico em cisteína) e P-IV (aquelas que têm na estrutura os domínios encontrados em P-III acrescido de domínio “lectin-like” conectado por pontes dissulfeto) (BJARNASON e FOX, 1995).



**Figura 1: Estruturas esquemáticas das metaloproteases de peçonhas de serpentes. Elas são classificadas dentro de quatro grupos de acordo com seus domínios estruturais. Fonte: Matsui et al., 2000.**

Os domínios “desintegrin-like”, presentes nas classes P-III e P-IV, possuem uma seqüência similar às de desintegrinas de veneno, mas são destituídos da típica seqüência RGD encontrada nas desintegrinas, apresentando diferentes seqüências nessa região (BJARNASON e FOX, 1994; HITE et al., 1994; PAINE et al.; 1992; GUTIÉRREZ e RUCAVADO, 2000).

Os domínios ricos em cisteína parecem estar envolvidos na inibição da agregação plaquetária e terem um importante papel na composição da atividade das toxinas da classe P-III (FOX e SERRANO, 2005). O domínio “lectin like” presente nas

metalo proteases P-IV pode atuar como marcador do alvo para a proteólise (HATI et al., 1999).

Mais recentemente, Fox e Serrano (2005) propuseram um esquema de classificação modificado, onde as classes P-II e P-III foram divididas em subclasses que refletem o potencial para o processamento proteolítico, bem como a formação de estruturas diméricas.

As SVMPs agem principalmente como fatores hemorrágicos, sendo as proteínas da coagulação sanguínea alvos de suas atividades proteolíticas, como o fibrinogênio e o fator de von Willebrand (RAMOS e SELISTRE-DE-ARAÚJO, 2006). Adicionalmente, as SVMPs podem também inibir a agregação plaquetária (LAING e MOURA-DA-SILVA, 2005) e provocar a liberação de citocinas (SCHATTNER et al., 2005). Esses dois últimos efeitos associados à digestão proteolítica da membrana basal são considerados os principais mecanismos de ação das SVMPs indutoras de hemorragia (RAMOS e SELISTRE-DE-ARAÚJO, 2006).

As proteínas da classe P-I possuem massa molecular entre 20 kDa e 30 kDa. Dentro da classe P-I, essas toxinas demonstraram uma grande variedade de atividades biológicas destacando-se a atividade hemorrágica, inflamatória, fibrinolítica e apoptótica. A elucidação das estruturas cristalinas de algumas SVMPs da classe P-I mostrou uma certa variabilidade quanto ao número de resíduos de cisteínas, o que sugere possibilidades de diferentes estruturas terciárias, devido ao potencial alternativo de pontes dissulfetos (FOX e SERRANO, 2005). Como exemplo de proteínas dessa classe, destacam-se a BaP1 isolada de *Bothrops asper* (GUTIÉRREZ et al., 1995), LHFII isolada de *Lachesis muta muta* (SANCHEZ et al., 1991) e neuwiedase isolada de *Bothrops pauloensis* (RODRIGUES et al., 2000).

A classe P-II de SVMP engloba proteínas com massa molecular entre 30 e 60 kDa e a classe P-III de SVMP compreende proteínas de massa molecular entre 60 e 80 kDa (BJARNASON e FOX, 1994).

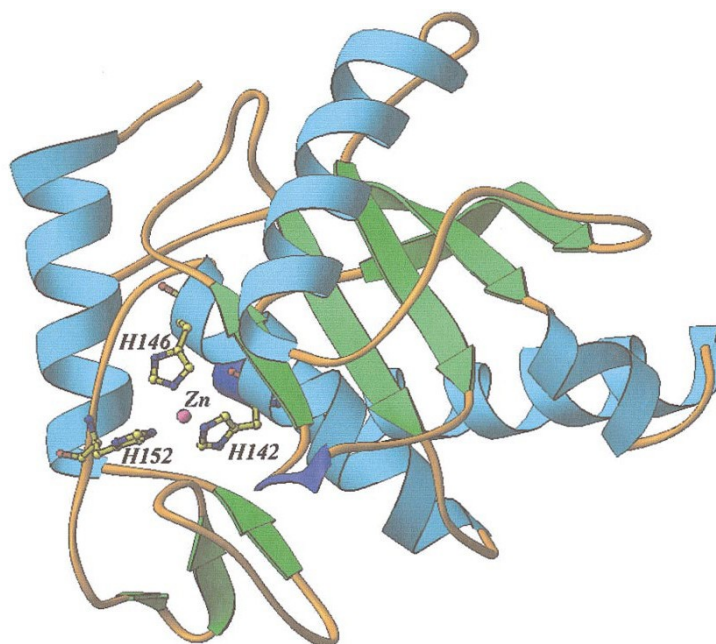
As proteínas pertencentes à classe P-IV de SVMP apresentam massa molecular entre 80 e 100 kDa (BJARNASON e FOX, 1994). Essa classe possui somente dois representantes e ainda não é certo se ela constitui realmente uma nova



classe de SVMP ou se é uma estrutura especial da classe P-III capaz de ser conectada por pontes dissulfeto com proteínas “lectin-like” disponíveis durante a produção do veneno (FOX e SERRANO, 2005).

### 1.1.2 Neuwiedase

A neuwiedase é uma metaloprotease da classe P-I, purificada a partir da peçonha de *Bothrops neuwiedi pauloensis*, atualmente denominada *Bothrops pauloensis*, serpente popularmente conhecida como jararaca-pintada. É membro da família das metzincinas cujos resíduos de aminoácidos presentes no sítio ligante de zinco His<sub>142</sub>Glu<sub>143</sub>XXHis<sub>146</sub>XXGly<sub>149</sub>XXHis<sub>152</sub> são totalmente conservados (RODRIGUES et al., 2000). O modelo estrutural da neuwiedase, com as três histidinas (142, 146, 152) ligadas ao sítio catalítico em destaque, está apresentado abaixo:



**Figura 2: Modelo molecular da neuwiedase desenhado no Programa RIBBONS segundo RODRIGUES et al., 2000. Na cor verde estão representadas as fitas  $\beta$ , em azul as  $\alpha$  hélices, em azul mais forte as hélices  $3_{10}$ ; os giros e “loops” estão coloridos em cor dourada. As três histidinas (142, 146, 152) do sítio catalítico estão mostradas em representações bola-bastão coloridas por tipo (C: amarelo, N: azul e O: vermelho) e o íon  $Zn^{2+}$  em vermelho vivo.**

A neuwiedase é uma  $\alpha$ -fibrinogenases isenta de atividade hemorrágica em teste subcutâneo, mas capaz de induzir hemorragia local quando aplicada intamuscularmente (BALDO et al., 2007) e causa hemorragia pulmonar quando administrada por via intravenosa (RODRIGUES et al., 2001). A neuwiedase induz evidente edema em patas de camundongos cujas bases farmacológicas ainda não estão elucidadas, embora a inibição dessa atividade por agentes quelantes indique que o efeito é dependente da atividade proteolítica (RODRIGUES et al., 2001). Quando altas doses de neuwiedase são administradas por via intramuscular, induzem reações inflamatórias concomitantes a mionecrose, as quais são caracterizadas pela presença de um infiltrado de leucócitos polimorfonucleares (RODRIGUES et al., 2001). A neuwiedase é capaz de degradar alguns componentes da matriz extracelular, como laminina, fibronectina e colágeno tipo I e essa propriedade é, em muitos casos, o principal fator agravante do efeito hemorrágico (RODRIGUES et al., 2000).

### **1.1.3 Aplicações terapêuticas**

Durante toda a sua história, a medicina utilizou substâncias químicas derivadas de plantas, animais e microorganismos para tratar doenças humanas. Toxinas naturais e seus derivados são largamente utilizados na descoberta de fármacos e conduzem ao desenvolvimento de muitos agentes terapêuticos (TEMPONE et al., 2007). A compreensão da ação de toxinas nos sistemas biológicos levou não só à investigação dos eventos e seqüelas apresentados no envenenamento, mas também ao interesse pelo potencial das mesmas em tratar alguns estados patológicos. Diversas peçonhas animais são alvos dessas investigações, como toxinas de abelhas, anfíbios, aranhas, escorpiões, formigas, serpentes e animais aquáticos.

O conhecimento do mecanismo de ação de toxinas animais tornou possível sua utilização na elaboração de drogas e aplicações clínicas. Essas toxinas e suas propriedades farmacológicas despertam o interesse de pesquisadores e indústrias farmacêuticas por serem importantes ferramentas para o desenho de modelos moleculares úteis na terapêutica.

Peptídeos potencializadores de Bradicinina (BPPs) encontrados em peçonhas de *Bothrops jararaca* são inibidores de ocorrência natural da enzima conversora de

angiotensina (ECA) somática. As propriedades químicas e farmacológicas desses peptídeos foram essenciais para o desenvolvimento do captopril, correntemente utilizado no tratamento da hipertensão humana (HAYASHI e CAMARGO, 2005).

Enzimas fibrinolíticas pouco tóxicas podem ser importantes agentes terapêuticos. A habilidade em degradar coágulos de fibrina e o fato de não serem susceptíveis aos inibidores de serinoproteases presentes na circulação sangüínea, gera um interesse no potencial terapêutico dessas enzimas para o uso como tratamento em pacientes com oclusão arterial ou doenças trombóticas venosas (MARKLAND, 1998). As SVSPs são bastante estudadas por mostrarem efeitos terapêuticos interessantes, já que são conhecidas por apresentarem uma ação desfibrinogênante “*in vivo*” (MARKLAND, 1998), podendo ser úteis na área médica em tratamentos clínicos de desordens do sistema de coagulação incluindo trombose das veias de maior calibre e infarto do miocárdio (YOU et al., 2004).

A enzima “thrombin-like” mais largamente utilizada é a batroxobina (Reptilase<sup>®</sup>, Pentapharm, Basel, Switzerland), purificada a partir da peçonha de *Bothrops atrox*. Essa enzima possui ação desfibrinogênante e é útil no tratamento de doenças cardiovasculares, como trombose e outras coagulopatias (MARSH e WILLIAMS, 2005).

A cola de fibrina derivada de veneno de serpente mimetiza etapas finais do processo de coagulação. O fibrinogênio do paciente ao interagir com uma “thrombin-like” presente no veneno de serpente libera uma fibrina monomérica que na presença do fator XIII e do cálcio torna-se polimérica, a qual age como cola biológica (STOLF e BARRAVIERA, 2000).

A Fibrolase, uma metaloprotease fibrinolítica de veneno de serpente de 23 kDa purificada a partir de *Agkistrodon contortrix contortrix*, foi empregada em algumas investigações pré-clínicas e clínicas (AHMED et al., 1990; MARKLAND et al., 1994; MARKLAND et al., 1996; SANCHEZ et al., 1997; SWENSON et al., 2000; SWENSON et al., 2004b; SWENSON e MARKLAND, 2005; TOOMBS, 2001; RAMOS e SELISTRE-DE ARAÚJO, 2006). Devido as suas atividades  $\alpha$  e  $\beta$  fibrinolítica, a fibrolase demonstrou ser eficaz na dissolução de coágulos na artéria femoral por meio de uma única administração intravenosa, sem efeitos adversos na pressão arterial ou frequência cardíaca (RAMOS e SELISTRE-DE-ARAÚJO, 2006).

Uma versão recombinante da fibrolase é a alfimeprase, a qual apresenta atividades enzimáticas semelhantes à primeira. Essa enzima encontra-se na fase clínica III nos Estados Unidos para o tratamento de oclusão arterial periférica e apresentou um positivo perfil de segurança na desobstrução vascular em uma larga extensão de condições trombóticas (SANCHEZ e SWENSON, 2005).

A jararagina, uma metaloprotease hemorrágica isolada da peçonha de *Bothrops jararaca*, apresentou resultados promissores sobre culturas de células de melanoma. O tratamento com essa metaloprotease alterou a morfologia celular, a viabilidade e a adesão às proteínas de matriz extracelular, resultando em uma significativa redução de metástases no pulmão (CORRÊA Jr. et al., 2002).

Anticorpos anti-neuwiedase são aptos a neutralizar a atividade hemorrágica do veneno bruto de *B. neuwiedi*. Esses resultados indicam que epítomos do domínio metaloprotease da neuwiedase (o único domínio que ela possui) exibem reações cruzadas com epítomos de metaloproteases com alta atividade hemorrágica presentes nesse veneno, resultando na neutralização da atividade hemorrágica (RODRIGUES et al., 2001). Essa observação sugere que metaloproteases de baixa ou nenhuma atividade hemorrágica podem ser úteis na produção de anticorpos neutralizantes contra toxinas hemorrágicas potentes e isso pode ter aplicações na produção de antivenenos que podem ser usados como antígenos em imunizações animais (RODRIGUES et al., 2001).

Os venenos brutos das serpentes de *Bothrops moojeni*, *Crotalus durissus terrificus*–Cdt, *Crotalus durissus cascavella*–Cdca e *Crotalus durissus collilineatus*–Cdcoll mostraram possuir eficiente atividade anti-leishmania (TEMPONE et al., 2001; PASSERO et al., 2007).

## **1.2 Toxoplasmose**

A toxoplasmose é uma doença infecciosa, congênita ou adquirida, causada por um protozoário do Filo Apicomplexa, parasita intracelular obrigatório, denominado *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*). O parasito foi descoberto em 1908, quase ao mesmo tempo e independentemente por Splendore em coelho, no Brasil, e logo depois por Nicolle & Manceaux no gundi, um roedor do norte da África (REY,

1991). A designação do parasita é originada do nome desse roedor (*Cterodactylus gondi*) onde o parasita foi isolado. A palavra *toxon* significa arco em grego e faz referência à forma arqueada do organismo (BLACK e BOOTHROYD, 2000).

A infecção com *T. gondii* ocorre no mundo inteiro, afetando mais de um terço da população mundial (MONTROYA e LIESENFELD, 2004), mas sua incidência é maior em áreas tropicais e diminui com o aumento da latitude (PETERSEN, 2007). A soroprevalência na Europa é alta, acima de 54% em países do sul europeu e diminui com o aumento da latitude, de 5 a 10% no norte da Suécia e Noruega (EVENGARD et al., 2001; JENUN, P. A. et al., 1998, PETERSEN et al., 2007). Variações na soroprevalência de *T. gondii* parecem ser correlacionadas a hábitos de alimentação e higiene de uma população (MONTROYA e LIESENFELD, 2004).

A infecção com *T. gondii* é comum na América do Sul e um estudo no Brasil encontrou que a soroprevalência é alta em populações com piores condições sócioeconômicas, provavelmente pela transmissão conduzida pela água (BAHIA-OLIVEIRA et al., 2003; PETERSEN, 2007).

Clinicamente, infecções com *T. gondii* podem passar despercebidas ou podem causar sintomas e sinais que variam dependendo do estado imune do paciente e do ambiente clínico, por exemplo, imunocompetentes, doenças oculares, imunocomprometidos e toxoplasmose congênita (MONTROYA e LIESENFELD, 2004).

Em humanos, a doença clínica é normalmente limitada à indivíduos imunocomprometidos ou à doença congênita resultante de infecção aguda na mulher grávida transmitida ao feto. Nas últimas duas décadas houve um dramático aumento no número de indivíduos imunocomprometidos e então um concomitante aumento da toxoplasmose (BLACK e BOOTHROYD, 2000).

A toxoplasmose é capaz de determinar nos indivíduos adultos um quadro agudo febril, com linfadenopatia, e, nas crianças, uma forma subaguda de encefalomielite e coriorretinite (REY, 1991).

As principais manifestações severas dessa doença envolvem o Sistema Nervoso Central (SNC) (CARRUTHERS, 2006). Danos no SNC por *T. gondii* são caracterizados por muitos focos de necrose ampliada e nódulos da microglia (LUFT et al.; MONTROYA e LIESENFELD, 2004).

Em casos de toxoplasmose congênita, a necrose cerebral é mais intensa no córtex e ganglia basal e às vezes em áreas periventriculares (FRENKEL, 1974; MONTOYA e LIESENFELD, 2004).

É desconhecido se a severidade da toxoplasmose em pessoas imunocompetentes se deve à linhagem do parasita, à variabilidade do hospedeiro ou a outros fatores (DUBEY et al., 2007).

O uso de marcadores genotipo-específicos tem permitido, ao menos parcialmente, a tipagem da linhagem de *T. gondii* em pacientes (PETERSEN, 2007). O *T. gondii* constitui-se de três linhagens clonais designadas tipo I, tipo II e tipo III, as quais diferem em virulência e modelos de ocorrência epidemiológica (SIBLEY e BOOTHROYD, 1992; HOWE e SIBLEY, 1995; MONTOYA e LIESENFELD, 2004). Foi proposto que os diferentes genotipos podem ser parcialmente responsáveis pelas diferentes patogenicidades observadas na infecção, entretanto, recentes estudos sugerem um cenário mais complexo no Brasil, onde parasitas patogênicos e não patogênicos isolados pertencem ao genotipo I (KHAN et al., 2005; PEYRON et al., 2006; PETERSEN, 2007).

### **1.2.1 Ciclo de vida do parasita**

*Toxoplasma gondii* é um protozoário intracelular obrigatório pertencente ao filo Apicomplexa, subclasse coccidia. Parasitas pertencentes a esse filo têm uma estrutura celular polarizada característica, um citoesqueleto complexo e uma organização de organelas no ápice (DUBEY et al., 1998; BLACK e BOOTHROYD, 2000). O *T. gondii* é capaz de infectar e replicar dentro de praticamente todas as células nucleadas de mamíferos e aves (DUBEY, 1998; WONG et al., 1993; BLACK e BOOTHROYD, 2000). Seu ciclo de vida é dividido entre infecções em felinos e não felinos, que estão relacionadas com a replicação sexuada e assexuada desse parasita, respectivamente (BLACK e BOOTHROYD, 2000). Ele pode se apresentar em diferentes formas: bradizoítos, taquizoítos e esporozoítos.

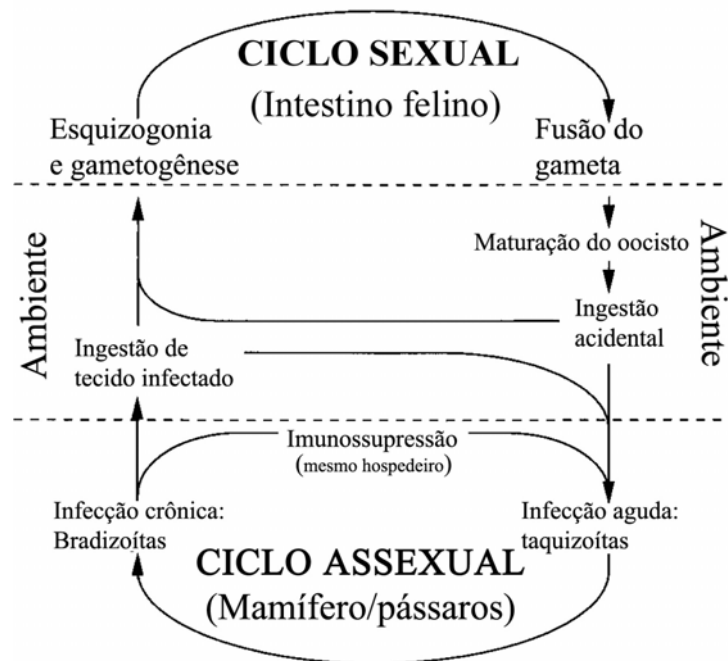
A replicação do *T. gondii* acontece no intestino de felinos, mais freqüentemente representados por gatos, caracterizando o ciclo sexual e resultando na produção de oocistos. Durante a infecção aguda alguns milhões de oocistos são eliminados nas fezes dos gatos por 7 a 21 dias (MONTOYA e LIESENFELD, 2004). Após a maturação do oocisto (iniciado após ser excretado pelo gato), o oocisto torna-se

altamente infectante e sobrevive no ambiente por meses e possivelmente anos (BLACK e BOOTHROYD, 2000). Qualquer animal homeotérmico que ingerir esses oocistos infecciosos se tornará um hospedeiro intermediário para o ciclo assexuado do parasita. Os esporozoítos que são liberados a partir dos oocistos irão infectar o epitélio intestinal e diferenciar-se no estágio de taquizoíto (BLACK e BOOTHROYD, 2000).

O estágio de taquizoíto define a forma de crescimento rápido do parasita encontrada durante a fase aguda da toxoplasmose (BLACK e BOOTHROYD, 2000). Os taquizoítos replicam dentro de uma célula por um tempo de procriação de 6 a 8 horas (*in vitro*) até romperem a célula e saírem para infectar células vizinhas, usualmente após 64 a 128 parasitas terem se acumulado na célula (RADKE e WHITE, 1998). Assim, depois de seguidas replicações, as células hospedeiras são rompidas e os taquizoítos são disseminados através da corrente sanguínea e infectam muitos tecidos, incluindo SNC, olhos, músculos cardíacos e esqueléticos e placenta. As formas taquizoítos causam uma forte resposta inflamatória e a destruição do tecido e, conseqüentemente, manifestações da doença. Os taquizoítos são transformados em bradizoítos mediante pressões da resposta imune para formar cistos (MONTROYA e LIESENFELD, 2004).

Os bradizoítos persistem dentro dos cistos durante a vida do hospedeiro. Eles são morfológicamente idênticos aos taquizoítos, mas multiplicam-se lentamente, expressam moléculas estágio-dependentes e são funcionalmente diferentes. Os cistos contêm centenas de milhares de bradizoítos e se formam dentro de células cerebrais, músculos cardíaco e esquelético dos hospedeiros (MONTROYA e LIESENFELD, 2004), o que caracteriza a fase crônica da toxoplasmose. Diante da ingestão desses cistos presentes em carne crua ou mal cozida de hospedeiros, os bradizoítos irão infectar o epitélio intestinal do próximo hospedeiro susceptível e diferenciar-se novamente em estágio de taquizoíto para completar o ciclo assexuado. Se a ingestão desses cistos for pelo gato, os bradizoítos podem se diferenciar em estágios sexuais, completando assim totalmente seu ciclo de vida (BLACK e BOOTHROYD, 2000).

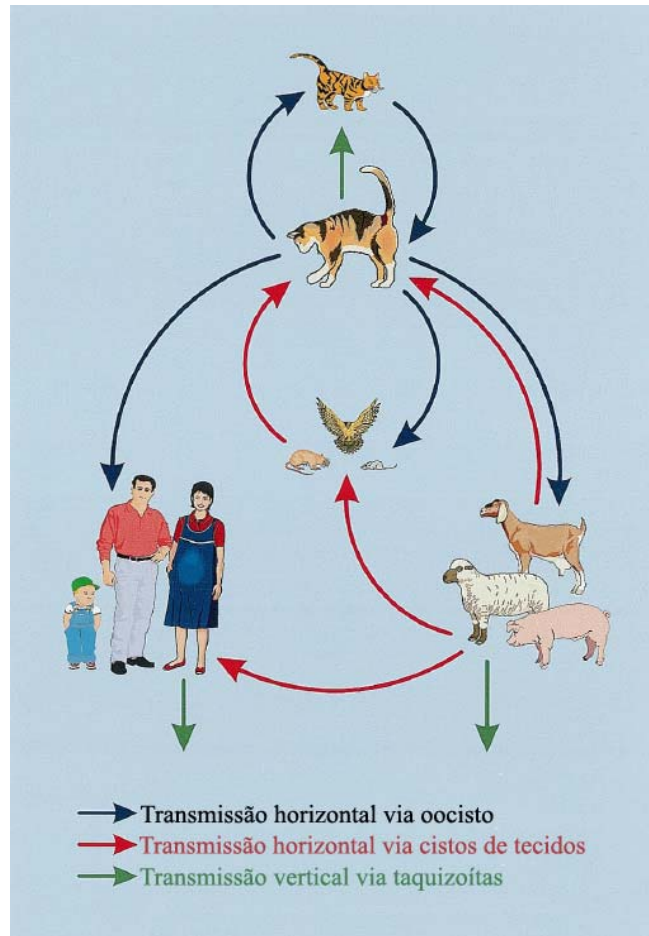
Na figura a seguir está esquematizada uma representação do ciclo de vida do *T. gondii*.



**Figura 3: Diagrama do ciclo de vida do *Toxoplasma gondii* segundo BLACK e BOOTHROYD, 2000.**

Os três estágios infectantes no ciclo de vida do *T. gondii* são taquizoítos, bradizoítos contidos nos cistos teciduais e esporozoítos contidos em oocistos esporulados. Esses estágios podem infectar hospedeiros definitivos e intermediários por uma das três rotas: (A) horizontalmente pela ingestão oral de oocistos infectados do ambiente; (B) horizontalmente através da ingestão oral de cistos teciduais contidos em carne crua e mal cozida, vísceras de hospedeiros intermediários, produtos sangüíneos, tecidos transplantados ou leite não pasteurizado; ou (C) verticalmente por transmissão placentária de taquizoítos (TENTER et al., 2000).





**Figura 4: Principais rotas de infecção segundo TENTER et al., 2000.**

O *T. gondii* pode ser transmitido do hospedeiro definitivo para o intermediário e vice-versa e também somente entre hospedeiros definitivos ou apenas entre hospedeiros intermediários. Deste modo, seu ciclo de vida pode continuar indefinidamente pela transmissão de cistos entre hospedeiros intermediários (na ausência de hospedeiros definitivos) ou pela transmissão de oocistos entre hospedeiros definitivos (também na ausência de hospedeiros intermediários) (TENTER et al., 2000).

A infecção primária por *T. gondii* adquirida por crianças e adultos (incluindo mulheres grávidas) imunocompetentes é assintomática na maioria dos pacientes. Em cerca de 10%, causa uma doença auto-limitada e não-específica e raramente necessita de tratamento (MONTROYA e LIESENFELD, 2004).

Ocasionalmente, vários sintomas fracos podem ser observados, dos quais a linfadenopatia é a mais significativa manifestação clínica (DUBEY, 1988; BOWIE et al., 1997; HO-YEN, 1992; TENTER et al., 2000). Manifestações severas como encefalite, choque séptico ou hepatite podem ocorrer, mas são muito raras em humanos imunocompetentes (HO-YEN, 1992; TENTER et al., 2000)

A infecção maternal antecedente à concepção normalmente exclui o risco da infecção fetal e da toxoplasmose congênita (BARBOSA et al., 2006). Se a infecção primária por *T. gondii* é adquirida até 4 meses antes da concepção, a imunidade protetora usualmente previne a transmissão vertical ao feto nas subseqüentes exposições (TENTER et al., 2000).

A freqüência com que a toxoplasmose é adquirida no período gestacional varia de 1 a 4 a cada 1000 mulheres grávidas em alguns países e a prevalência da infecção congênita é de 0,2 a 2 por 1000 nascimentos (WILLIAMS et al., 1981; SHARIF et al., 2007)

A infecção maternal no primeiro e segundo trimestre de gestação gera menor risco de transmissão, mas resulta em toxoplasmose congênita grave e pode levar à morte do feto no útero e abortos espontâneos. Por contraste, a infecção maternal tardia (terceiro trimestre) usualmente resulta em neonatos de aparência normal e maior freqüência de transmissão (MONTROYA e LIESENFELD, 2004).

O diagnóstico imediato e tratamento das infecções de *T. gondii* em gestantes pode prevenir a transmissão materno-fetal do parasita (NIELSE et al., 2005; PETERSEN, 2007). Cerca de 10% da infecção pré-natal resulta em aborto ou morte neonatal (REMINGTON e DESMONTS, 1995; CHATTERTON, 1992; TENTER et al., 2000).

Sinais da tríade clássica de toxoplasmose (retinocoroidite, calcificações intracraniana e hidrocefalia) manifestam-se em 10 % desses neonatos, enquanto os outros recém nascidos mostram uma variedade de sintomas, abrangendo o SNC e sintomas não específicos da fase aguda (retinocoroidite, convulsões, esplenomegalia, hepatomegalia, febre, anemia, icterícia, linfadenopatia, etc.).

Embora essas crianças possam parecer saudáveis ao nascimento, elas podem desenvolver sintomas clínicos e deficiências ao longo da vida (TENTER et al., 2000). Essas deficiências afetam predominantemente os olhos (retinocoroidite,

estrabismo e cegueira), o SNC (deficiências psicomotoras ou neurológicas, convulsões e retardo mental) ou os ouvidos (surdez) (REMINGTON e DESMONTS, 1995; CHATTERTON, 1992; McLOAD e BOYER, 2000; TENTER et al., 2000).

A toxoplasmose pode ser uma ameaça à vida de indivíduos imunocomprometidos (LIESENFELD et al., 1999; MONTOYA e LIESENFELD, 2004). Nessas pessoas, a toxoplasmose aparece quase sempre como resultado da reativação da infecção crônica (PORTER e SANDE, 1992; MONTOYA e LIESENFELD, 2004).

Em todo o mundo, *T. gondii* causa severa encefalite em mais de 40 % dos pacientes aidéticos e de 10 a 30% desses pacientes sucumbem a doença (LUFT, 1989; HO-YEN, 1992; AMAMASSARI et al., 1996; TENTER et al., 2000).

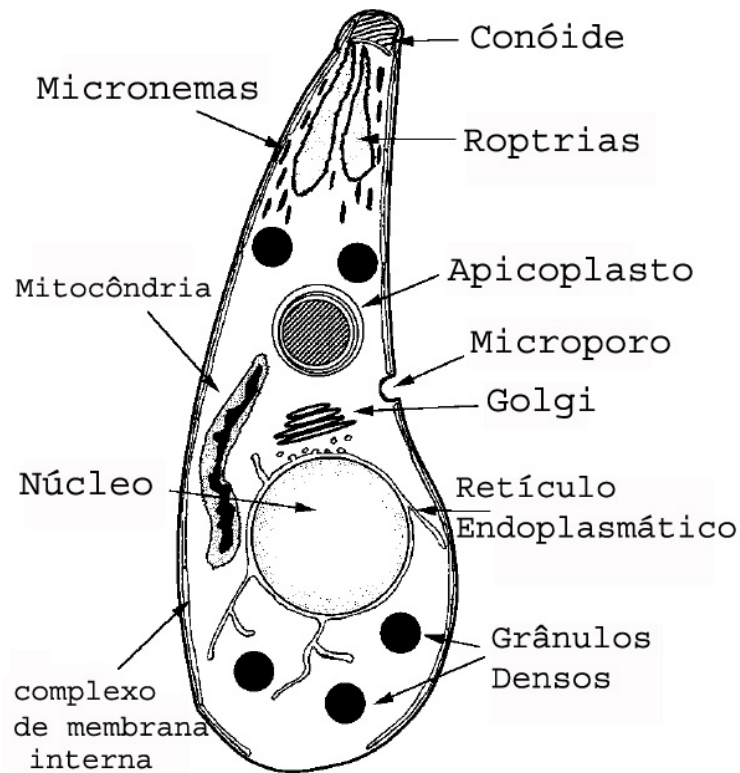
### **1.2.2 *Toxoplasma gondii*: morfologia e mecanismos de invasão**

*Toxoplasma*, como seus companheiros do filo apicomplexa *Plasmodium* (malária) e *Cryptosporidiosis* (criptosporidiose) desfrutam de um estilo de vida intracelular livre de muitas repostas do sistema imune do hospedeiro, com as quais outros microorganismos extracelulares se deparam. Isso deve ao sucesso com que eles entram na célula alvo e evitam as defesas do hospedeiro como acidificação ou hidrolases endolisossomais (CARRUTHERS e BOOTHROYD, 2007).

Dado o estilo de vida intracelular obrigatório, não é surpreendente que o *T. gondii* tenha uma soma de organelas secretórias reguladas. Essas incluem micronemas apicais (do grego “filamentos pequenos”) e roptrias (do grego “em forma de cassetete”) e grânulos densos (BLACK e BOOTHROYD, 2000).

O citoesqueleto do *T. gondii* é um complexo arranjo de microtúbulos e outras estruturas macromoleculares que aparentemente estão envolvidos na integridade estrutural, na condução da secreção polarizada e na aptidão do parasita em deslizar e invadir sobre a superfície das células hospedeiras (FRIXIONE et al., 1996; MORISSETE et al., 1997; NICHOLS e CHIAPPINO, 1987; BLACK e BOOTHROYD, 2000). Na ponta anterior da célula, dois anéis pré-conoidais circundam o cume de uma estrutura semelhante a um tubo, chamada conóide. O conóide consiste de 14 elementos que movem-se em forma de espiral em sentido anti-horário como percebido no pólo posterior (BLACK e BOOTHROYD, 2000).

Foi postulado que os microtúbulos funcionam como uma armação direcionando essas organelas a passar através do conóide e secretar seus conteúdos a partir da ponta apical (NICHOLS e CHIAPPINO, 1987; BLACK e BOOTHROYD, 2000).



**Figura 5 :Morfologia e organelas do *T. gondii* em seu estágio taquizoíta segundo BLACK e BOOTHROYD, 2000.**

Localizadas tanto na porção anterior do parasita quanto no complexo da membrana interna, estão as proteínas com função mecânica actina e miosina. O complexo da membrana interna (CMI) consiste em vesículas de membrana lisa que se encontram abaixo da membrana plasmática. Essa estrutura trimembranosa (duas membranas do CMI e uma da membrana plasmática) é chamada de película e se localiza a partir dos anéis pré-conoidais na porção anterior até a porção posterior final da célula (OGINO e YONDEDA, 1966; BLACK e BOOTHROYD, 2000). Há somente uma interrupção neste complexo, como observado na figura 6, que é o microporo posicionado no meio do corpo do

parasita. Acredita-se que este poro é o local ativo de endocitose e vesículas são observadas nessa região (NICHOLS et al., 1994; BLACK e BOOTHROYD, 2000).

*T. gondii* usa a mobilidade de deslizamento para aproximar-se da célula do hospedeiro alvo e escorregar ao longo de sua superfície. A mobilidade de deslizamento é dirigida pelo sistema motor actina-miosina localizado dentro da película do parasita (DOBROWOLSKI E SIBLEY, 1996; CARRUTHERS, 2006), o qual conecta-se com o complexo da membrana interna (GASKINS et al., 2004; CARRUTHERS, 2006) e proteínas transmembranas adesivas secretadas a partir dos micronemas (JEWETT E SIBLEY, 2003; CARRUTHERS, 2006).

A membrana plasmática desse parasita consiste predominantemente de uma variedade de proteínas que são ligadas à membrana por uma glicosilfosfatidilinositol (GPI). Uma família de proteínas relacionadas a antígenos de superfície (SAGs) constituem a maior parte dos componentes de superfície (BLACK e BOOTHROYD, 2000). A SAG1 é um importante ligante do parasita envolvido na invasão à célula hospedeira (MINEO e KASPER, 1994).

Ao encontrar um local satisfatório para a invasão, o parasita descarrega as secreções das organelas para mediar a entrada na célula do hospedeiro (CARRUTHERS e SIBLEY, 1997). Como um primeiro evento, o conteúdo dos micronemas congrega-se à superfície anterior do parasita e então liga-se aos receptores hospedeiros para mediar a fixação apical. Imediatamente após, os conteúdos das roptrias são expelidos através do ducto apical, possivelmente um processo em dois estágios, onde proteínas do gargalo da roptria (RON) aparecem primeiro seguidas pelas proteínas do bulbo da roptria (ROP) (ALEXANDER et al., 2005; LEBRUN et al., 2005; CARRUTHERS, 2006).

A invasão do *Toxoplasma* na célula hospedeira é descrita em sete passos (CARRUTHERS e BOOTHROYD, 2007). A fixação é reversível e envolve o reconhecimento de receptores de superfície por SAGs. Após essa fase inicial há a fixação apical que envolve a organização cálcio-dependente das MICs (proteínas secretadas pelos micronemas) e sua acumulação na superfície apical. A extrusão do conóide parece ocorrer nesse mesmo ponto. As proteínas ROM formam um complexo estável com AMA1, uma outra proteína do micronema conhecida como antígeno de membrana apical. Essas proteínas cooperam para formar uma estrutura notável conhecida por junção de movimento (MJ), sendo esse o terceiro

estágio da invasão. Imediatamente depois, as ROPs são injetadas dentro do citoplasma do hospedeiro no local da invasão (quarta etapa). O parasita penetra ativamente por “cooperação” com proteínas transmembranas (quinta fase). Posteriormente há a invaginação da membrana plasmática do hospedeiro para a criação do vacúolo parasitóforo (PV). O parasita quando entra na célula se localiza dentro do vacúolo parasitóforo e por isso fica protegido da degradação intracelular. Enquanto os passos iniciais 1 a 5 são concluídos em 15 a 20 segundos, os passos finais, encerramento e separação se completam em 1 a 2 minutos. O encerramento envolve a divisão do vacúolo parasitóforo e da membrana plasmática do hospedeiro, o que é seguido pelo evento final: a compressão e separação completa do vacúolo parasitóforo (CARRUTHERS e BOOTHROYD, 2007). Essas etapas estão representadas na figura 6.

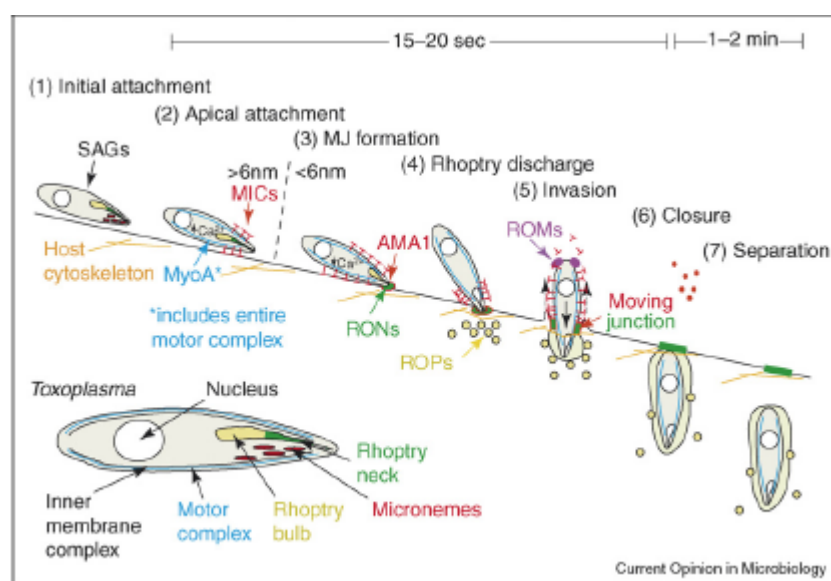


Figura 6: Os sete passos de invasão do *Toxoplasma*, segundo CARRUTHERS e BOOTHROYD, 2007, onde:

**SAGs:** proteínas de superfície de antígenos

**AMA1:** antígeno de membrana apical

**MICs:** proteínas secretadas pelos micronemas

**ROMs:** proteínas do gargalo das roptrias

**ROPs:** proteínas do bulbo das roptrias

**MJ:** junção de movimento

A resposta imune à infecção por *Toxoplasma gondii* é individual, complexa e compartimentada. Esse parasita tem a capacidade de se propagar em todos os tecidos e cada compartimento tecidual tem sua própria resposta imune específica, particularmente o Sistema Nervoso Central e a placenta. Os macrófagos, linfócitos T e células NK e por outro lado, as citocinas são os principais elementos envolvidos na resposta imune de indivíduos imunocompetentes. Anticorpos desempenham papéis secundários, mas permanecem essenciais no diagnóstico da toxoplasmose em humanos (FILISETTI e CANDOLFI, 2004).

*T. gondii* é capaz de disparar a ativação não específica de macrófagos e células Natural Killer (NK) (HAUSER et al., 1983) juntamente com outras células hematopoiéticas e não-hematopoiéticas. Esta ativação pretende limitar a proliferação do parasita por ação citotóxica direta ou indireta e disparar uma resposta imune específica devido à apresentação de antígenos do *Toxoplasma* (FILISETTI e CANDOLFI, 2004).

A inibição da replicação do *Toxoplasma* ou sua destruição são resultados de vários mecanismos efetores: a) mecanismos oxidativos (MURRAY e COHN, 1979; HUGHES, 1998); b) mecanismos não-oxidativos, representados principalmente pela produção de óxido nítrico (NO) por macrófagos ativado por IFN- $\gamma$  (DRAPIER et al., 1988; ADAMS et al., 1990), com NO envolvido também durante a fase crônica na inibição da proliferação intracerebral do parasita (SCHUTLER, 1999); c) mecanismos não-dependentes de oxigênio podem também ser toxoplasmicida, como a indução por IFN- $\gamma$  da enzima Indoleamina 2,3 dioxigenase, a qual degrada o triptofano requerido para o crescimento do parasita (PFEFFERKORN et al., 1986).

Células não hematopoiéticas (fibroblastos, células endoteliais e epiteliais, etc.) são também capazes de reduzir a proliferação do parasita por mecanismos dependentes de Ferro, óxido nítrico sintases (iNOS), IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  (BOUT et al., 1999; YAP e SHER, 1999; FILISETTI e CANDOLFI, 2004).

As células efetoras exercem suas funções via atividade citotóxica e/ou secreção de citocinas envolvidas na regulação da resposta imune (HUNTER et al., 1994). Linfócitos T CD 8<sup>+</sup> e CD 4<sup>+</sup> são os principais agentes envolvidos na resistência do hospedeiro à infecção por *T. gondii* (SUZUKI e REMINGTON, 1988). Em camundongos, linfócitos T maduros são divididos em duas subpopulações: Th1 e

Th2. Esta distinção é baseada na relação de citocinas secretadas após a estimulação, como reportado por Mossman em 1986 (FILISSETTI e CANDOLFI, 2004). A resistência é relatada à resposta Tipo 1 promovida por IFN-  $\gamma$  e IL-12 produzidos após ativação das células NK e macrófagos (SHARMA et al., 1985; SUZUKI et al., 1988; GAZZINELLI et al., 1993; FILISSETTI e CANDOLFI, 2004).

Entretanto, é sabido que o controle da infecção é resultado da ação sinérgica entre linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> (NAGASAWA et al., 1991; GAZZINELLI et al., 1991; FILISSETTI e CANDOLFI, 2004).

Os macrófagos possuem função imune e são responsáveis pela produção de citocinas e quimiocinas e recrutamento de outras células inflamatórias.

O contato com agentes exógenos (por exemplo, microorganismos ou produtos destes) e a subsequente indução de mediadores endógenos (citocinas e quimiocinas) durante a resposta inflamatória contribuem para o recrutamento de linfócitos circulantes. Estes se tornam ativados no sítio de infecção e liberam mensageiros secundários (compostos reativos de oxigênio) capazes de matar microorganismos e remodelar os tecidos (proteases) (GOUWY et al, 2005).

Citocinas são proteínas secretadas por células do sistema imune inato e adaptativo que medeiam muitas funções dessas células (ABBAS e LICHTMAN, 2003). Essas proteínas exercem suas funções em baixas concentrações (FILISSETTI e CANDOLFI, 2004).

O fator de crescimento tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) parece ser essencial pra ativação do macrófago e inibição da replicação do parasita, mas essa ação pode somente ser exercida em sinergia com o IFN. A interleucina 12 (IL-12), a qual é secretada por macrófagos e células dendríticas durante a estimulação pelo antígeno, parece desempenhar o principal papel anti-*Toxoplasma* durante a fase aguda da infecção. A IL-12 é também essencial na fase crônica da infecção, quando é responsável pela manutenção da resposta imune a longo prazo (FILISSETTI e CANDOLFI, 2004).

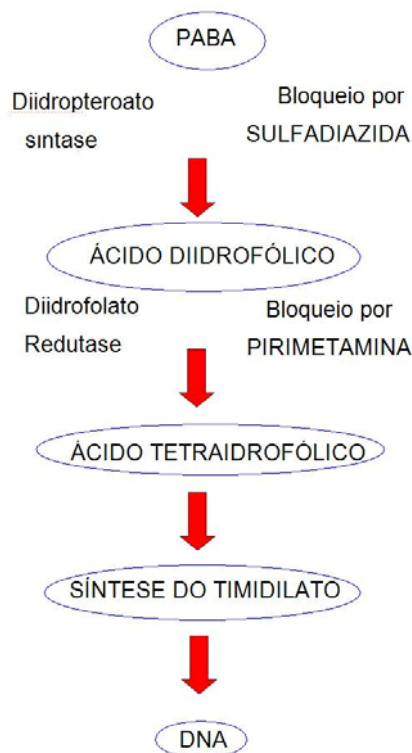
Um refinado balanço entre citocinas pró e anti-inflamatórias, entre as quais IL-12 e IL-10 respectivamente, é essencial para o controle da infecção por *Toxoplasma* ( ALDEBERT et al., 2007)



O controle da infecção por *T. gondii* é complexo e depende das bases genéticas do hospedeiro, seu estado imune e também fatores inerentes ao parasita, incluindo virulência (FILISETTI e CANDOLFI, 2004).

### 1.2.3 Terapia recorrente

A terapia de primeira escolha para o tratamento da toxoplasmose é a combinação de duas drogas, a sulfadiazina e a pirimetamina. A inibição de duas etapas de uma via metabólica essencial para a sobrevivência do parasita explica a sinergia entre essas duas drogas. Essas duas etapas envolvidas são a utilização do ácido *p*-aminobenzóico (PABA) para a síntese do ácido diidropteróico, catalisada pela diidropteroato sintase é inibida pelas sulfonamidas, e a redução da diidrofolato em tetraidrofolato, catalisada pela diidrofolato redutase é inibida pela pirimetamina (GOODMAN & GILMAN, 2003).



**Esquema da via metabólica da síntese de DNA, alvo da terapia combinada de sulfadiazina e pirimetamina.**

No entanto, a terapia antifolato descrita acima é freqüentemente mal tolerada ou causa reações alérgicas nos pacientes (CARRUTHERS, 2006).

Alguns fenômenos básicos do ciclo dos taquizoítos são bem descritos enquanto poucas moléculas envolvidas são identificadas e importantes questões permanecem sem resposta (BLACK e BOOTHROYD, 2000). Outras vias podem ser interessantes como alvos para intervenções terapêuticas. A principal proteína de superfície dos taquizoítos, a SAG1, é importante na fixação e por isso constitui potencial molécula de ataque. A invasão celular é um evento essencial no ciclo de vida de parasitas apicomplexos e recebe particular atenção (CARRUTHERS, 2006). A forma de locomoção dos parasitas nesse processo, chamada de motilidade de deslizamento, é acompanhada por uma série de proteases que desempenham papéis centrais. A identificação de inibidores seletivos dessas proteases pode ser um importante passo no desenvolvimento de novos agentes terapêuticos.

Assim, novas perspectivas de controle da infecção por *T. gondii* são almejadas no sentido de gerar uma estratégia que vise bloquear não apenas a replicação intracelular, mas também outras etapas fundamentais no ciclo lítico desse parasita.

### 1.3 Referências bibliográficas

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H. **Cellular and Molecular Immunology**. 5ª ed. Philadelphia: W. B. Saunders, 2003, 562 p.

ADAMS, L.; HIBBS, J.; TAINTOR, R.; KRAHENBUHL, J. Microbiostatic effect of murine-activated macrophages for *Toxoplasma gondii*. **Journal of Immunology**, v. 144, p. 2407-2412, 1990.

AHMED, N. K.; GADDIS, R. R.; TENNANT, K. D.; LACZ, J. P. Solution structure of kistrin, a potente platelet aggregation inhibitor and GP IIb-IIIa antagonist. **Science**, v. 253, p. 445-448, 1991.

ALDEBERT, D.; DURAND, F.; MERCIER, C.; BRENIER-PINCHART, M. P.; CESBRON-DELAUW, A. F.; PELLOUX, H. *Toxoplasma gondii* triggers secretion of interleukin-12 but low level of interleukin-10 from the THP-1 human monocytic cell line. **Cytokine**, v. 37, p. 206-221, 2007.

ALEXANDER, D. L.; MITAL, J.; WARD, G. E.; BRADLEY, P.; BOOTHROYD, J. C. Identification of the moving junction complex of *Toxoplasma gondii*: a collaboration between distinct secretory organelles. **PLoS Pathogens**, v. 1, p. 17, 2005.

AMMASSARI, A.; MURRI, R.; CINGOLANI, A.; de LUCA, A.; ANTINORI, A. AIDS-associated cerebral toxoplasmosis: an update on diagnosis and treatment. In: Gross, U. ***Toxoplasma gondii***. Berlin: Springer-Verlag, p. 209-222, 1996.

BAHIA-OLIVEIRA, L. M.; JONES, J. L.; AZEVEDO-SILVA, J.; ALVES, C. C., OREFICE, F.; ADDISS, D.G.; Highly endemic, waterborne toxoplasmosis in north Rio de Janeiro state, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 9, p. 55-62, 2003.

BALDO, C.; TANJONI, I.; LÉON, I. R.; BATISTA, I. F. C.; DELLA-CASA, M. S.; CLISSA, P. B.; WEINLICH, R.; LOPES-FERREIRA, M.; LEBRUN, I.; AMARANTE-MENDES, G. P.; RODRIGUES, V. M.; PERALES, J.; VALENTE, R. H.; MOURA-DASILVA, A. M. BnP1, a novel P-I metalloproteinase from *Bothrops neuwiedi* venom: Biological effects benchmarking relatively to jararhagin, a P-III SVMP. **Toxicon** (2007)

BARBOSA, B. F.; SILVA, D. A. O.; COSTA, I. N.; PENA, J. D. O.; MINEO, J. R.; FERRO, E. A. V. Susceptibility to vertical transmission of *Toxoplasma gondii* is temporally dependent on the preconceptional infection in *Calomys callosus*. **Placenta**, v. 28, p. 624-630, 2007.

BIONDO, R.; PEREIRA, A.M.S.; MARCUSSI, S.; PEREIRA, P. S.; FRANÇA, S. C.; SOARES, A. M. Inhibition of enzymatic and pharmacological activities of some snake venoms and toxins by *Mandevilla velutina*(Apocynaceae) aqueous extract. **Biochimie**, v. 85, p. 1017-1025, 2003.

BJARNASON, J. B.; FOX, J. W.; Hemorrhagic metalloproteinases from snake venoms. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 62, p. 325-372, 1994.

BJARNASON, J. B.; FOX, J. W. Snake venom metalloproteinases: reprotlysins. **Methods in Enzymology**, v. 248, p. 345-368, 1995.

BLACK, M. E.; BOOTHROYD, J. C. Lytic Cycle of *Toxoplasma gondii*. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 64, p. 607-623, 2000.

BODE, W.; GOMIS-RÜTH, F. X.; STOCKLER, W. Astacins, serralytins, snake venom and matrix metalloproteinases exhibit identical zinc-binding environments (HEXXHXXGXXH and Met-turn) and topologies and should be grouped into a common family, the "metzincins". **FEBS Letters**, v. 331, p. 134-140, 1993.

BOUT, D.; MORETTO, M.; DIMIER-POISSON, I.; GATEL, D. B. Interaction between *Toxoplasma gondii* and enterocyte. **Immunobiology**, v. 201, p. 225-228, 1999.

BOWIE, W. R.; KING, A. S.; WERKER, D. H. et al. Outbreak of toxoplasmosis associated with municipal drinking water. **The Lancet**, v. 350, p. 173-177, 1997.

BRAUD, S.; BON, C.; WISNER, A. Snake venom proteins acting on hemostasis. **Biochimie**: Elsevier, v.82, p.851-859, 2000.

CASTRO, H. C.; ZINGALI, R. B.; ALBUQUERQUE, M. G.; PUJOL-LUZ, M.; RODRIGUES, C. R. Snake venom thrombin-like enzymes: from reptilase to now. **CMLS Cellular and Molecular Life Sciences**, v.61, p.843-856, 2004.

CARDOSO, J. L. C. **Animais peçonhentos no Brasil : Biologia clínica e terapêutica dos acidentes**. São Paulo-SP: Sarvier, 2003.

CARRUTHERS, V. B. Proteolysis and *Toxoplasma* invasion. **International Journal for Parasitology**, v. 36, p. 595-600, 2006.

CARRUTHERS, V. B.; BOOTHROYD, J. C. Pulling together: an integrated model of *Toxoplasma* cell invasion. **Current Opinion in Microbiology**, v. 10, p. 83-89, 2007.

CARRUTHERS, V. B.; SIBLEY, L.D. Sequential protein secretion from three distinct organelles of *Toxoplasma gondii* accompanies invasion of human fibroblasts. **European Journal of Cell Biology**, v. 73, p. 114-123, 1997.

CHATTERTON, J. M. W. Pregnancy. In: Ho-Yen, D. O.; Joss, A. W. L. Human **Toxoplasmosis**. Oxford: Oxford University Press, p. 144-183, 1992.

COMINETTI, M. R.; RIBEIRO, J. U. ; FOX, J. W.; SELISTRE-DE-ARAÚJO, H. S. BaG, a new dimeric metalloproteinase/disintegrin from the Bothrops alternatus snake venom that interacts with  $\alpha_5\beta_1$  integrin. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 416, p. 171-179, 2003.

CORRÊA, M. C.; MARIA, D. A.; MOURA-DA-SILVA, A. M.; PIZZOCARO, K. F.; RUIZ, I. R. G. Inhibition of melanoma cells tumorigenicity by the snake venom toxin jararhagin. **Toxicon**, v. 40, p. 739-748, 2002.

DAMICO, D. C. S.; NASCIMENTO, J. M.; LOMONTE, B. PONCE-SOTO, L. A.; JOAZEIRO, P. P.; NOVELLO, J. C.; MARANGONI, S.; COLLARES-BUZATO, C. B. Cytotoxicity of *Lachesis muta muta* snake (bushmaster) venom and its purified basic phospholipase A<sub>2</sub> (LmTX-I) in cultured cells. **Toxicon**, v. 49, p. 678-692, 2007.

DENNIS, E. A. Diversity of group types, regulation and function of phospholipase A<sub>2</sub>. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 269, p. 13057-13060, 1994.

DIAZ, B. L.; ARM, J. P. Phospholipase A<sub>2</sub>. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 56, p. 87-97, 2003.

DOBROWOLSKI, J. M.; SIBLEY, L. D. *Toxoplasma* invasion of mammalian cells is powered by the actin cytoskeleton of the parasite. **Cell**, v. 84, p. 933-939, 1996.

DRAPIER, J.; WIETZERBIN, J.; HIBBS, J. Interferon- gamma and tumor necrosis factor induce the L-arginine-dependent cytotoxic effector mechanism in murine macrophages. **European Journal of Immunology**, v. 18, p. 1587-1592, 1988.

DUBEY, J. P. Advances in the life cycle of *Toxoplasma*. **International Journal for Parasitology**, v. 28, p. 1019-1024, 1998.

DUBEY, J. P. Re-examination of resistance of *Toxoplasma gondi* tachyzoites and bradyzoites to pepsin and trypsin digestion. **Parasitology**, v. 116, p. 43-50, 1998.

DUBEY, J. P. *Toxoplasma*, *Neospora*, *Sarcocystis*, and other tissue cyst-forming coccidia in humans and animals. In: Kreier J. P. **Parasitic protozoa**, 2<sup>a</sup> ed. Parasitic protozoa, v. 6, p. 1-158, 1993.

DUBEY, J. P.; BEATTIE, C. P. **Toxoplasmosis of animals and man**. Boca Raton, FL: CRC Press, 1988.

DUBEY, J. P.; CORTÉS-VECINO, J. A.; VARGAS-DUARTE, J. J.; SUNDAR, N.; VELMURUGAN, G. V.; BANDINI, L. M.; POLO, L. J.; ZAMBRANO, L.; MORA, L. E.; KWOK, O. C. H.; SMITH, T.; SU, C. Prevalence of *Toxoplasma gondii* in dogs from Colombia, South America and genetic characterization of *T. gondii* isolates. **Veterinary Parasitology**, v. 145, p. 45-50, 2007.

DUBEY, J. P.; LINDSAY, D. S.; SPEER, C. A. Structures of *Toxoplasma gondii* tachyzoites, bradyzoites and sporozoites and biology and development of tissue cysts. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 11, p. 267-299, 1998.

ESCALANTE, T.; SHANNON, J.; MOURA-DA-SILVA, A. M.; GUTIÉRREZ, J. M.; FOX, J. W. Novel insight into capillary vessel basement membrane damage by snake venom hemorrhagic metalloproteinases: A biochemical and immunohistochemical study. **Archives of Biochemical and Biophysics**, v. 455, p. 144-153, 2006.

EUROPEAN COLLABORATIVE STUDY AND RESEARCH NETWORK ON CONGENITAL TOXOPLASMOSIS. Low incidence of congenital toxoplasmosis in children born to women infected with human immunodeficiency virus. **European Journal of Obstetrics, Gynecology and Reproductive Biology**, v. 68, p. 93-96, 1996.

EVANS, R. Life cycle and animal infection. In: Ho-Yen D. O., Joss, A. W. L. **Human toxoplasmosis**. Oxford: Oxford University Press, p. 26-55, 1992.

EVENGARD, B., PETERSSON K., ENGMAN, M. L., et al. Low incidence of toxoplasma infection during pregnancy and in newborns in Sweden. **Epidemiology and Infection**, v. 127, p. 121-127, 2001.

FERREIRA ADE, M.; VITOR, R. W.; GAZZINELLI, R. T.; MELO, M. N. Genetic analysis of natural recombinant Brazilian *Toxoplasma gondii* strains by multilocus PCR-RFLP. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 6, p. 22-31, 2006.

FILISSETTI, D.; CANDOLFI, E. Immune response to *Toxoplasma gondii*. **Annali dell'Istituto superiore di sanità**, v. 40, p. 71-80, 2004.

FOX, J. W.; LONG, C. The ADAMs/MDC family of proteins and their relationships to snake venom metalloproteinases. In: Bailey, G. (Ed.), **Snake Venom Enzymes**. Alaken Press, Ft Collins, CO, p. 151-187.

FOX, J. W.; SERRANO, S. M. T. S. M. T. Structural considerations of the snake venom metalloproteinases, key members of the M12 reprolysin family of metalloproteinases. **Toxicon**, v. 45, p. 969-985, 2005.

FRENKEL, J. K. Pathology and pathogenesis of congenital toxoplasmosis. **Bulletin of the New York Academy of Medicine**, v. 50, p. 182-191, 1974.

FRIXIONE, E.; MONDRAGON, R.; MEZA, I. Kinematic analysis of *Toxoplasma gondii* motility. **Cell Motility and the Cytoskeleton**, v. 34, p. 152-163, 1996.

GASKINS, E.; GILK, S.; DEVORE, N.; MANN, T.; WARD, G.; BECKERS, C. Identification of the membrane receptor of a class XIV myosin in *Toxoplasma gondii*. **The Journal of Cell Biology**, v. 165, p. 383-393, 2004.

GAZZINELLI, R.; HIENY, S.; WYNN, T.; WOLF, S.; SHER, A. Interleukin 12 is required for the T-lymphocyte-independent induction of interferon  $\gamma$  by an intracellular parasite and induces resistance in T-cell-deficient hosts. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 90, p. 6115-6119, 1993.

GAZZINELLI, R. T.; HAKIM, F. T. HIENY, S. SHEARER, G. M.; SHER, A. Synergistic role CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T lymphocytes in IFN- $\gamma$  production and protective immunity induced by an attenuated *Toxoplasma gondii* vaccine. **Journal of Immunology**, v. 146, p. 286-292, 1991.

GOODMAN & GILMAN; **As bases farmacológicas da terapêutica**; 10<sup>a</sup> ed, Rio de Janeiro: Editora McGrawHill, 2003.

GOUWY, M.; STRUYF, S.; PROOST, P.; VAN DAMME J. Sinergy in cytokine and chemokine networks amplifies the inflammatory response. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 16, p. 561-580, 2005.

GRIGG, M. E.; GANATRA, J.; BOOTHROYD, J. C.; MARGOLIS, T. P. Unusual abundance of atypical strains associated with human ocular toxoplasmosis. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 184, p. 633-639, 2001.



GUTIÉRREZ, J. M.; ROMERO, M.; DÍAZ, C.; BORKOW, G.; OVADIA, M. Isolation and characterization of a metalloproteinase with weak hemorrhagic activity from the venom of snake *Bothrops asper* (Terciopelo). **Toxicon**, v. 33, p. 19-29, 1995.

GUTIÉRREZ, J. M.; RUCAVADO, A. Snake venom metalloproteinases: Their role in the pathogenesis of local tissue damage. **Biochimie**, v. 82, p. 841-850, 2000.

GUTIÉRREZ, J. M.; RUCAVADO, A.; ESCALANTE, T.; DÍAZ, C. Hemorrhage induced by snake venom metalloproteinases: biochemical and biophysical mechanisms involved in microvessel damage. **Toxicon**, v. 45, p. 997-1011, 2005.

GUYTON; HALL; **Fisiologia Humana e Mecanismos das doenças**, 6ª ed, Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, , 1998.

HATI, R.; MITRA, P.; SARKER, S.; BHATTACHARYYA, K. K. Snake venom hemorrhagins. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 29, p. 1-19, 1999.

HAUSER, W.; SHARMA, S.; REMINGTON, J. Augmentation of NK cell activity by soluble and particulate fractions of *Toxoplasma gondii*. **Journal of Immunology**, v. 131, p. 458-463, 1983.

HAYASHI, M. A. F.; CAMARGO, A. C. M. The Bradykinin-potentiating peptides from venom gland and brain of *Bothrops jararaca* contain highly site specific inhibitors of the somatic angiotensin-converting enzyme. **Toxicon**, v. 45, p. 1163-1170, 2005.

HILL, D.; DUBEY, J. P. *Toxoplasma gondii*: transmission, diagnosis and prevention. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 8, p. 634-640, 2002.

HITE, L. A.; JIA, L. G.; BJARNASON, J. B.; FOX, J. W. cDNA sequences for four snake venom metalloproteinases: structure, classification, and their relationship to

mammalian reproductive proteins. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 308, p. 182-191, 1994.

HOLLAND, G. N.; LEWIS, K. G. An update on current practices in the management of ocular toxoplasmosis. **American Journal of Ophthalmology**, v. 134, p. 102-114, 2002.

HOWE, D. K.; SIBLEY, L. D. *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 172, p. 1561-1566, 1995.

HO-YEN, D. O. Clinical features. In: Ho-Yen, d. O., Joss, A. W. L. **Human Toxoplasmosis**. Oxford: Oxford University Press, p. 56-78, 1992.

HO-YEN, D. O. Immunocompromised patients. In: Ho-Yen, D. O.; Joss, A. W. L. **Human Toxoplasmosis**. Oxford: Oxford University Press, p. 184-203, 1992.

HUGHES, H. P. A. Oxidative killing of intracellular parasites mediated by macrophages. **Parasitology Today**, v. 4, p. 340-347, 1988.

HUNTER, C.; SUBAUSTE, C.; REMINGTON, J. The role of cytokines in toxoplasmosis. **Biotherapy**, v. 7, p. 237-247, 1994.

JENUN, P. A., STRAY-PEDERSEN, B.; MELBY, K. K.; KAPPERUD, G.; WHITELAW, A.; ESKIL, A., et al. Incidence of *Toxoplasma gondii* infection in 35,940 pregnant women in Norway and pregnancy outcome for infected women. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, p. 2900-2906, 1998.

JEWETT, T. J.; SUBLEY, L. D. Aldolase forms a bridge between cell surface adhesions and the actin cytoskeleton in apicomplexan parasites. **Molecular Cell**, v. 11, p. 885-894, 2003.

JOHNSON, A. M. Speculation on possible life cycles for the clonal lineages in the genus *Toxoplasma*. **Parasitology Today**, v. 13, p. 393-397, 1997.

KHAN, A.; TAYLOR, S.; SU, C. et al. Composite genome map and recombination parameters derived from three arquetypal lineages of *Toxoplasma gondii*. **Nucleic Acids Research**, v. 33, p. 2980-2992, 2005.

KOSKINIEMI, M.; LAPPALAINEN, M; HELDMAN, K. Toxoplasmosis needs evaluation: an overview and proposals. **American Journal of Diseases of Children**, v. 143, p. 724-728, 1989.

LAING, G. D.; MOURA-DA-SILVA, A. M.; Jararhagin and its multiple effects on hemostasis. **Toxicon**, v. 45, p. 987-996, 2005.

LEBECH, M.; PETERSEN, E. et al. Reihenuntersuchung von Neugeborenen auf angeborene Toxoplasmosis in Dänemark aufgrund mütterlicher Serumkonversion während der SCHWANGERSCHAFT. Mitt Österr Ges **Tropenmedizin und Parasitologie**, v. 18, p. 33-40, 1996.

LEBRUN, M.; MICHELIN, A.; EL HAJJ, H.; PONCET, J.; BRADLEY, P. J.; VIAL, H.; DUBREMETZ, J. F. The rhoptry neck protein RON4 re-localizes at the moving junction during *Toxoplasma gondii* invasion. **Cellular Microbiology**, v. 7, p. 1823-1833, 2005.

LIESENFELD, O.; WONG, S. Y.; REMINGTON, J. S. Toxoplasmosis in the setting of AIDS. In: Bartlett, J. G., Merigan, T. C., Bolognesi, D. **Textbook of AIDS medicine**, 2<sup>a</sup> ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1999.

LUFT, B. J. *Toxoplasma gondii*. In: Walzer, P. D., Genta, R. M. **Parasitic infections in the compromised host**. New York: Marcel Dekker, p. 179-279, 1989.

LUFT, B. J.; CONFEEY, F.; REMINGTON, J. S. et al. Outbreak of centraus-nervous-system toxoplasmosis in western Europe and North America. **The Lancet**, v. 1, p. 781-784, 1983.

LUFT, B. J.; HAFNER, R. KORZUN, A. H. ET AL. Toxoplasmosis encephalitis in patients with the acquired immunodeficiency syndrome. **The New England Journal of Medicine**, v.329, p. 995-1000, 1993.

LYNN, W.; LIGHTMAN, S. The eye in systemic infection. **The Lancet**, v. 364, p. 1439-1450, 2004.

MACKENZIE, C. R.; LANGEN, R.; TAKIKAWA, O.; DAUBENER, W. Inhibition of indoleamine 2,3-dyoxigenase in human macrophages inhibits interferon-gamma – induced bacteriostasis but does not abrogate toxoplasmastasis. **European Journal of Immunology**, v. 29, p. 3524-3561, 1999.

MAGALHÃES, A.; FERREIRA, R. N.; RICHARDSON, M.; GONTIJO, S.; YARLEQUE, A.; MAGALHÃES, H. P. B.; BLOCH, C.; SANCHEZ, E. F. Coagulant thrombin-like enzymes from the venoms of Brazilian and Peruvian bushmastes (*Lachesis muta muta*) snakes. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part B 136, p. 255-266, 2003.

MARKLAND, F. S. Fibrolase, an active thrombolytic enzyme in a arterial and venoums thrombosis model system. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v.391, p. 427-438, 1996.

MARKLAND, F. S. Snake venoms and the hemostatic system. **Toxicon**, v. 36, p. 1749-1800, 1998.

MARKLAND, F. S.; FRIEDRICHS, G. S.; PEWITT, S. R.; LUCCHESI, B. R. Thrombolytic effects of recombinant fibrolase or APSAC in a canine model of carotid artery thrombosis. **Circulation**, v. 90, p. 2448-2456, 1994.

MARSH, N.; WILLIAMS, V. Snake venoms toxins in haemostasis. **Toxicon**, v. 45, p. 1171-1181, 2005.

MATSUI, T.; FUJIMURA, Y.; TITANI, K. Snake venoms proteases affecting hemostasis and thrombosis. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1477, p. 146-156, 2000.

McLEOD, R.; BOYER, K. Management of and outcome for the newborn infant with congenital toxoplasmosis. In: Ambroise-Thomas, P.; Petersen, E. et al.. **Congenital toxoplasmosis :scientific background, clinical management and control**. Paris: Springer-Verlag, p. 189-213, 2000.

MINEO, J. R.; KASPER, L. H. Attachment of *Toxoplasma gondii* to host cells involves Major Sufaces Protein, SAG1 (P30). **Experimental Parasitology**, v. 79, p. 11-20, 1994.

MINKOFF, H.; REMINGTON, J. S.; HOLMAN, S.; RAMIRES, R.; GOODWIN, S.; LANDESMAN, S. Vertical transmission of toxoplasma by human immunodeficiency virus-infected women. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 176, p. 555-559, 1997.

MONTOYA, J. G.; LIESENFELD, O. Toxoplasmosis. **The Lancet**, v. 363, p. 1965-1976, 2004.

MONTOYA, J. G.; REMINGTON, J. S. Studies on the serodiagnosis of toxoplasmic lymphadenitis. **Clinical Infectuous Diseases**, v. 20, p. 3112-3115, 1995.

MURRAY, H. W.; COHN, Z. A. Macrophage oxygen-dependent antimicrobial activity. I. Susceptibility of *Toxoplasma gondii* to oxygens intermediates. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 150, p. 938-949, 1979.

NAGASAWA, H.; MANABE, T.; MAEKAWA, Y.; OKA, M.; HIMENO, K. Role of L3T4+ and Lyt-2+ T cell subsets in protective immune responses of mice against infection with a low or high virulent strain of *Toxoplasma gondii*. **Microbiology and Immunology**, v. 35, p. 215-222, 1991.

NICHOLS, B. A.; CHIAPPINO, M. L. Cytoeskeleton of *Toxoplasma gondii*. **The Journal of Protozoology**, v. 34, p. 217-226, 1987.

NICHOLS, B. A.; CHIAPPINO, M. L.; O'CONNOR, G. R. Secretion from the rhoptries of *Toxoplasma gondii* during host-cell invasion. **Journal of Ultrastructural Research**, v. 83, p. 85-98, 1983.

NICHOLS, B. A.; CHIAPPINO, M. L. PRAVESIO, C. E. N. Endocytosis at the micropore of *Toxoplasma gondii*. **The Journal of Protozoology**, v. 80, p. 81-98, 1994.

NIELSEN, H. V.; SCHIMIDT, D. R.; PETERSEN, E. Diagnosis of congenital toxoplasmosis by two-dimensional immunoblot differentiation of mother and child IgG profiles. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, p. 711-715, 2005.

OGINO, N.; YONDEDA, C. The fine structure and mode of division of *Toxoplasma gondii*. **Archives of Ophthalmology**, v. 75, p. 218-227.

PAINE, M. J. I.; DESMOND, H. P.; THEAKSTON, R. D. G. CRAMPTON, J. M. Purification, cloning and molecular characterization of a high molecular weight hemorrhagic metalloprotease, jararhagin, from *Bothrops jararaca* venom. Insights into the disintegrin gene family. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 267, p. 22869-22876, 1992.

PASSERO, L. F. D.; TOMOKANE, T. Y.; CORBETT, C. E. P.; LAURENTI, M. D.; TOYAMA, M. H. Comparative studies of the anti-leishmanial activity of three *Crotalus durissus* ssp. venoms. **Parasitology Research**, v. 101, p. 1365-1371, 2007.

PETERSEN, E. Toxoplasmosis. **Seminars in Fetal & Neonatal Medicine**, v. 12, p. 214-223, 2007.

PEYRON, F.; LOBRY, J.; MURET, K.; FERRANDIZ, J.; GOMEZ-MARIN, J. E. PETERSEN, E. et al. Serotyping of *Toxoplasma gondii* in pregnant women. Predominance of type II in the old world and type I and II in the new world. **Microbes and Infection**, v. 8, p. 2333-2340, 2006.

PFEFFERKORN, E. R.; REBHUN, S. ECKEL, M. Characterization of an indoleamine 2,3-dyoxigenase induced by gamma-interferon in cultured human fibroblasts. **Journal of Interferon Research**, v. 6, p. 267-279, 1986.

PORTER, S. B.; SANDE, M. Toxoplasmosis of the central nervous system in the Acquired Immunodeficiency Syndrome. **The New England Journal of Medicine**, v.327, p. 1643-1648, 1992.

QUIÑONES, A. M.; TORRES, J. R.; RUBIN, M. R. Biochemical detection, pharmacological inhibition, and phylogenetic analysis of *Caenorhabditis elegans* metalloproteases. **Bios**, v. 77, p. 113-126, 2006.

RAMOS, O. H. P.; SELISTRE-DE-ARAÚJO, H. S. Snake venom metalloproteases-structure and function of catalytic and desintegrin domains. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part C 142, p. 328-346, 2006.

RAWLINGS, N. D.; BARRET, A. J. Evolutionary families of metallopeptidases. **Methods in Enzymology**, v. 248, p. 183-228, 1995.

REMYINGTON, J. S.; DESMONTES, G. Toxoplasmosis. In: Remington, J. S., Klein, J. O. **Infectious diseases of the fetus and newborn infant**, 3<sup>a</sup> ed. Philadelphia: W B Saunders, p. 140-267, 1990.

REMINGTON, J. S.; McLEOD, R.; TUKKIEZ, P.; .; DESMONTES, G. Toxoplasmosis. In: Remington, J. S., Klein, J. O. Infectious diseases of the fetus and newborn infant, 5<sup>a</sup> ed. Philadelphia: **W B Saunders**, p. 205-346, 2001.

REY, L. **Parasitologia**. 3<sup>o</sup> ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A.; 2001. 856p.

RIEMANN, H. P.; MEYER, M. E.; THEIS, J. H.; KELSO, G.; BEHYMER, D. E. Toxoplasmosis in an infant fed unpasteurized goat milk. **The Journal of Pediatrics**, v. 87, p. 573-576, 1975.

RODRIGUES, V. M.; MARCUSSI, S.; CAMBRAIA, R. S.; ARAÚJO, A. L.; MALTANETO, N. R.; HAMAGUCHI, A.; FERRO, E. A. V.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I.; GIGLIO, J. R.; SOARES, A. M. Bactericidal and neurotoxic activities of two myotoxic phospholipases A<sub>2</sub> from *Bothrops neuwiedi pauloensis* snake venom. **Toxicon**, v.44, p. 305-314, 2004.

RODRIGUES, V. M.; SOARES, A. M.; ANDRIÃO-ESCARSO, S. H.; FRANCESCHI, A. M.; RUCAVADO, A.; GUTIÉRREZ, J. M.; GIGLIO, J. R. Pathological alterations induced by neuwiedase, a metalloproteinase isolated from *Bothrops neuwiedi* snake venom. **Biochimie**, v. 83, p. 471-479, 2001.

RODRIGUES, V. M.; SOARES, A. M.; GUERRA-SÁ, R.; RODRIGUES, V.; FONTES, M. R. M.; GIGLIO, J. R. Structural and functional characterization of Neuwiedase, a nonhemorrhagic fibrin(ogen)olytic metalloprotease from *Bothrops neuwiedi* snake venom. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 381, p. 213-224, 2000.

SACKS, J. J.; ROBERTO, R. R.; BROOKS, N. F. Toxoplasmosis infection associated with raw goat's milk. **Journal of the American Medical Association**., v. 248, p. 1728-1732, 1982.



SANCHEZ, E. F.; BUSH, L. R.; SWENSON, S.; MARKLAND, F. S. Chimeric fibrolase: covalent attachment of an RGD-like peptide to create a potentially more effective thrombolytic. **Thrombosis Journal**, v. 87, p. 289-302, 1997.

SANCHEZ, E. F.; MAGALHÃES, A.; MANDELBAUM, F. R. DINIZ, C. R. Purification and characterization of hemorrhagic factor II from the venom of bushmaster snake (*Lachesis muta muta*). **Biochemical et Biophysica Acta**, v. 1074, p. 347-356, 1991.

SANCHEZ, E. F.; SWENSON, S. Proteases from South American snake Venoms affecting Fibrinolysis. **Current Pharmaceutical Analysis**, v. 3, nº 2, 2007.

SATAKE, M.; MURATA, Y.; SUZUKI, T.; Studies on snake venom. XIII. Chromatographic separation and properties of three proteinases from *Agkistrodon halys blomhoffi* venom. **Journal of Biochemistry**, v. 54, p. 438-443, 1963.

SCHATTNER, M.; FRITZEN, M.; VENTURA, J. de S.; de ALBUQUERQUE MODESTO, J. C.; POZNER, R. G.; MOURA-DA-SILVA, A. M.; CHUDZINSKI-TAVASSI, A. M. The snake venom metalloproteases berythrin and jararhagin activate endothelial cells. **Biological Chemistry**, v. 386, p. 369-374, 1995.

SERRANO, S. M. T.; MAROUN, R. C. Snake venom serine proteinases: sequence homology vs. substrate specificity, a paradox to be solved. **Toxicon**, v.45, p.1115-1132, 2005.

SHARIF, M.; ZIAEI, H.; DARYANI, A.; AJAMI, A. Seroepidemiological study of toxoplasmosis in intellectual disability children in rehabilitation centers of northern Iran. **Research in Developmental Disabilities**, v. 28, p. 219-224, 2007.

SHARMA, S. D.; HOFFLIN, J. M.; REMINGTON, J. S. in vivo recombinant interleukin 2 administration enhances survival against a lethal challenge with *Toxoplasma gondii*. **Journal of Immunology**, v. 135, p. 4160-4163, 1985.

SCHKUTER, D.; DECKERT-SCHLUTER, M.; LORENZ, E.; MEYER, T.; ROLLINGHOFF, M.; BOGDAN, C. Inhibition of inducible nitric oxide synthase exacerbates chronic cerebral toxoplasmosis in *Toxoplasma gondii*-susceptible C57BL/6 mice but does not reactivate the latent disease in *T. gondii*-resistant BALB/c mice. **Journal of Immunology**, v. 162, p. 3512-3518, 1999.

SIBLEY, L. D.; BOOTHROYD, J. C. Virulent strains of *Toxoplasma gondii* comprise a single clonal lineage. **Nature**, v. 359, p. 82-85, 1992.

SOARES, A. M.; GIGLIO, J. R. Chemical modifications of phospholipases A<sub>2</sub> from snake venoms; effects on catalytic and pharmacological properties. **Toxicon**, v. 42, p. 855-868, 2003.

STOLF, H. O.; BARRAVIERA, S. R. C. S. Cola biológica: Cola a base de veneno de cobra e sangue de boi. **Medicina Social**, v. 12, p. 8-9, 2000.

SUZUKI, Y.; ORELLANA, M. A.; SCHREIBER, R. D.; REMINGTON, J. S. Interferon-gamma: the major mediator of resistance against *Toxoplasma gondii*. **Science**, v. 240, p. 516-518, 1988.

SUZUKI, Y.; REMINGTON, J. Dual regulation of resistance against *Toxoplasma gondii* infection by Lyt-2<sup>+</sup>, L3T4<sup>+</sup> T cells in mice. **Journal of Immunology**, v. 140, p. 3943-3946, 1988.

SWENSON, S.; MARKLAND Jr., F.S. Snake venoms fibrinolytic enzymes. **Toxicon**, v. 45, p. 1021-1039, 2005.

SWENSON, S.; TOOMBS, C. F.; PENA, L.; JOHANSSON, J.; MARKLAND Jr., F.S. Alpha-fibrinogenases. **Currents Drug Targets Cardiovascular & Haematological Disorders**, v. 4, p. 417-435, 2004b.

TEIXEIRA, C. F. P.; LANDUCCI, E. C. T.; ANTUNES, E., CHACUR, M.; CURY, Y. Inflammatory effects of snake venom myotoxic phospholipases A<sub>2</sub>. **Toxicon**, v. 42, p. 947-962, 2003.

TEMPONE, A. G.; ANDRADE, H. F.; SPENCER, P. J.; LOURENÇO, C. O.; ROGERO, J. R.; NASCIMENTO, N. *Bothrops moojeni* venom kills *Leishmania* spp. with hydrogen peroxide generated by its L-Amino acid oxidase. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 280, p. 620-624, 2001.

TEMPONE, A. G.; MELHEM, M. S. C.; PRADO, F. O.; MOTOIE, G.; HIRAMOTO, R. M.; ANTONIAZZI, M. M.; HADDAD, C. F. B.; JARED, C. Amphibian secretions for drug discovery studies: a search for new antiparasitic and antifungal compounds. **Letters in Drug Design & Discovery**, v. 4, p. 67-73, 2007.

TENTER, A. M.; HECKEROTH, A. R.; WEISS, L. M. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. **International Journal for Parasitology**, v. 30, p. 1217-1258, 2000.

TOOMBS, C. F.; Alfimeprase: pharmacology of a novel fibrinolytic metalloproteinase for thrombolysis. **Haemostasis**, v. 31, p. 141-147, 2001.

TOYAMA, M. H.; TOYAMA, D. O.; PASSERO, L. F. D.; LAURENTI, M. D.; CORBETT, C. E.; TOMOKANE, T. Y.; FONSECA, F. V.; ANTUNES, E.; JOAZEIRO, P. P.; BERIAM, L. O. S.; MARTINS, M. A. C.; MONTEIRO, H. S. A.; FONTELES, M. C. Isolation of a new L-amino acid oxidase from *Crotalus durissus cascavella* venom. **Toxicon**, v. 47, p. 47-57, 2006.

WALLON, M.; LIOU, C.; GARNER, P.; PEYRON, F. Congenital toxoplasmosis: systematic review of evidence of efficacy of treatment in pregnancy. **British Medical Journal**., v. 318, p. 1511-1514, 1999.

WARREL, D.A. Clinical features of envenoming from snake bites. In: Bon, C., Goyffon, M. (Eds.), *Envenomings and Their Treatments*. **Fondation Marcel Me´rieux**, Lyon, p. 63–76, 1996.

WARREL, D.A. Clinical toxicology of snakebite in Asia. In: Meier, J., White, J. (Eds.), **Handbook of Clinical Toxicology of Animal Venoms and Poisons**. CRC Press, Boca Raton, Florida, p. 493–594, 1995.

WILLIAMS, K. A. B.; MACFARLANE, D. E.; WILLIAMS, J. M.; ELIASJONES, T. F.; WILLIAMS, H. Congenital toxoplasmosis: A prospective survey in the West of Scotland. **The Journal of Infection**, v. 3, p. 219-229, 1981.

WOLFSBERG, T.G.; PRIMAKOFF, P.; MYLES, D.G.; WHITE, J.M. ADAM, a novel family of membrane proteins containing A Disintegrin And Metalloprotease domain: multipotential functions in cell-cell and cellmatrix interactions. **The Journal of Cell Biology**, v. 131, p. 275-278, 1995.

WONG, S. Y.; REMINGTON, J. S. Biology of *Toxoplasma gondii*. **AIDS**, v. 7, p. 299-316, 1993.

YAP, G. S.; SHER, A. Effector cells of both nonhemopoietic and hemopoietic origin are required for interferon (IFN)-gamma and tumor necrosis factor (TNF)-alpha-dependent host resistance to the intracellular pathogen, *Toxoplasma gondii*. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 189, p. 1083-1092, 1999.

YOU, W-K.; CHOI, W-S.; KOH, Y-S.; SHIN, H-C.; JANG, Y.; CHUNG, K-H. Functional characterization of recombinant batroxobin, a snake venom thrombin-like enzyme, expressed from *Pichia pastoris*. **FEBS Letters**, v.571, p.67-73, 2004.

## Capítulo 2

**Efeitos da neuwiedase, uma metaloprotease isolada de peçonha de  
serpente, sobre a invasão e proliferação de *Toxoplasma gondii* em  
fibroblastos humanos**

Luciana Machado Bastos<sup>a</sup>, Robson J. de Oliveira Júnior<sup>a</sup>, Deise Aparecida  
Oliveira Silva<sup>b</sup>, José Roberto Mineo<sup>b</sup>, Carlos Ueira Vieira<sup>c</sup>, David Nascimento Silva  
Teixeira<sup>c</sup>, Maria Inês Homs-Brandeburgo<sup>a</sup>, Veridiana de Melo Rodrigues<sup>a</sup>, Amélia  
Hamaguchi<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup>Instituto de Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia-  
Uberlândia-MG, Brazil.

<sup>b</sup> Laboratório de Imunoparasitologia, Instituto de Ciências Biomédicas,  
Universidade Federal de Uberlândia-Uberlândia-MG, Brazil.

<sup>c</sup> Disciplina de Laboratório Clínico, Departamento de Clínica Médica, Universidade  
Federal do Triângulo Mineiro- Uberaba-MG, Brazil.

\*Autor correspondente: Tel (fax): +55-34-3218-2203

E-mail: hamaguchi@ufu.br (A. Hamaguchi)

## **Resumo**

A infecção por *T. gondii* afeta mais de um terço da população mundial, manifestando-se principalmente em indivíduos imunodeprimidos e na infecção congênita. Terapias em uso são limitadas pela resistência do parasita e efeitos adversos. Assim, a busca de novas drogas para o controle dessa infecção é importante. Neste trabalho, avaliamos os efeitos da neuwiedase, uma metaloprotease isolada da peçonha da serpente *Bothrops pauloensis*, sobre a invasão e proliferação *in vitro* do *T. gondii* em fibroblastos humanos. Os resultados obtidos mostraram que o tratamento realizado sobre células previamente infectadas ou sobre o parasita antes da infecção, apresentou níveis de inibição da infecção de 71 % e 61%, respectivamente. Os mecanismos de ação da neuwiedase precisam ser mais bem investigados, mas a capacidade dessa enzima em degradar alguns componentes da matriz extracelular, como laminina, fibronectina e colágeno tipo I pode ser importante na diminuição da invasão de células hospedeiras pelo *T. gondii*.

## **Palavras chave:**

*Toxoplasma gondii*; Neuwiedase; Toxoplasmose; Toxinas de serpente; Atividade *in vitro*; Fibroblastos humanos.

## **Abstract**

The infection for *T. gondii* affects more than a third of the world population, affecting mainly immunocompromised individuals. Therapies in use are limited because of parasite resistance and side effects. Then, the search for new drugs to control infection is extremely important. The effects of neuwiedase, an isolated metalloprotease from *Bothrops pauloensis* venom, on the *in vitro* invasion and proliferation of the *T. gondii* in human fibroblasts was investigated. The treatment was done on cells previously infected and on the parasite before the infection, and results showed infection inhibition levels of 71% and 61%, respectively. The mechanisms involved in neuwiedase action need to be better investigated, but the capacity of enzyme to degraded some extracellular matrix components such as laminin, fibronectin and collagen type I can be important in the reduction of host cells invasion by *T. gondii*.

**Key words:** *Toxoplasma gondii*; neuwiedase; snake venom; humans fibroblasts, cytokines, chemokines



## 2.1. Introdução

A neuwiedase é uma metaloprotease isolada a partir da peçonha bruta de *Bothrops pauloensis* (*B. pauloensis*). Essa proteína pertence à classe P-I de metaloproteases, as quais possuem somente um domínio metaloprotease e dependem de  $Zn^{2+}$  para exercerem seu efeito catalítico. A neuwiedase é não hemorrágica e representa somente 4,5 % (p/p) do veneno de *B. pauloensis*. Sua composição em aminoácidos mostra similaridades com outras metaloproteases com relação a altas proporções de Asx, Glx, Leu e Ser. Sua massa molecular é de aproximadamente 24 a 25 kDa e seu pI é 5,9 (Rodrigues et al., 2000).

A neuwiedase é uma enzima  $\alpha$ -fibrinogenolítica e capaz de atuar também sobre proteínas de matriz extracelular como laminina, fibronectina e colágeno tipo I em uma variedade de pequenos peptídeos (Rodrigues et al., 2000).

A toxoplasmose é uma doença infecciosa, congênita ou adquirida, causada por um protozoário do filo Apicomplexa, subclasse coccídeo, denominado *Toxoplasma gondii*. Ele é um parasita intracelular obrigatório e tem o gato como seu hospedeiro definitivo e animais homeotérmicos como hospedeiros intermediários (Hill et al., 2005). A infecção por *Toxoplasma* ocorre no mundo todo e infecta mais de um terço da população mundial (Montoya e Liesenfeld, 2004), mas sua incidência é maior em áreas tropicais e diminui com o aumento da latitude (Petersen, 2007). Em humanos, as manifestações clínicas são geralmente limitadas a indivíduos imunocomprometidos ou à doença congênita resultante da infecção aguda em gestantes (Black e Boothroyd, 2000).

Há três estágios no ciclo de vida do *T. gondii*, sendo taquizoítos, bradizoítos contidos em cistos teciduais e esporozoítos contidos em oocistos

esporulados (Tenter et al., 2000). A infecção é principalmente adquirida pela ingestão de alimentos e água contaminados com oocistos eliminados nas fezes dos gatos ou pela ingestão de carne crua ou mal cozida contendo cistos teciduais (Montoya e Liesenfeld, 2004) ou verticalmente por transmissão placentária de taquizoítos (Tenter et al., 2000).

A maioria das infecções adquiridas são assintomáticas (Sharif et al., 2007), mas os sintomas podem variar com o estado imune do paciente ou com o cenário clínico, isto é, toxoplasmose ocular e toxoplasmose congênita (Montoya e Liesenfeld, 2004). Ocasionalmente, vários sintomas brandos podem ser observados, dentre os quais linfadenopatia é a manifestação clínica mais significativa (Dubey e Beattie, 1988; Bowie et al., 1997; Ho-Yen, 1992; Tenter et al., 2000). Algumas manifestações como encefalite, choque séptico, miocardite ou hepatite podem ocorrer, mas são muito raras em humanos imunocompetentes (Ho-Yen, 1992; Tenter et al., 2000). Infecções com *T. gondii* são uma importante causa de coriorretinite (Wilder, 1952; Tenter et al., 2000). A doença congênita pode levar graves danos à criança, como cegueira e retardo mental (Hill e Dubey, 2002).

A combinação de sulfatiazida e pirimetamina é o tratamento de primeira escolha da maioria das apresentações clínicas de toxoplasmose (Petersen e Schmidt, 2003; Ferreira et al., 2006). Terapias em uso são limitadas pela resistência, toxicidade ao hospedeiro e efeitos adversos. Particularmente, drogas derivadas de sulfas causam sérios efeitos adversos como alergias na pele e supressão da medula óssea (Joss, 1992; Subauste e Remington, 1993; Kim et al., 2007).

Durante toda sua história, a medicina utilizou substâncias químicas derivadas de plantas, animais e microorganismos para tratar doenças humanas (Koehn e Carter, 2005; Tempone et al., 2007). Toxinas naturais e seus derivados são largamente utilizados na descoberta de fármacos e conduzem ao desenvolvimento de muitos agentes terapêuticos (Lewis e Garcia, 2003; Tempone et al., 2007).

O presente estudo tem por objetivo a caracterização, *in vitro*, dos efeitos da neuwiedase sobre a invasão e proliferação do *Toxoplasma gondii* em fibroblastos humanos e o perfil de citocinas produzidas sob essas condições.

## **2.2. Material e métodos**

### **2.2.1 Reagentes**

A peçonha bruta de *Bothrops pauloensis* foi obtida junto ao serpentário da Pentapharm do Brasil Comércio e Exportação Ltda, Minas Gerais, Brasil. A neuwiedase foi purificada a partir dessa peçonha como previamente descrito (Rodrigues et al., 2000). O veneno e a neuwiedase liofilizados foram pesados, dissolvidos em solução salina tamponada com fosfato, pH 7,2 (PBS) e centrifugada a 3000 x g por 10 min. Os sobrenadantes foram coletados e as concentrações de proteína foram estimadas pelo método de BRADFORD (1976).

### **2.2.2 Cultura de células**

Fibroblastos humanos (HFF) foram obtidos de *American Type Culture Collection* (ATCC, Manassas, USA) e cultivados em garrafas de cultura de tecidos de 25 cm<sup>2</sup> até atingirem a confluência. As células foram cultivadas em meio RPMI

completo, consistindo de meio RPMI-1640 (Gibco, Paisley, UK) suplementado com HEPES 25 mM, L-glutamina 2 mM, penicilina 100 U/mL, estreptomicina 100 µg/mL (todos reagentes obtidos da Sigma Chemical Co., St. Louis, USA) e soro fetal bovino 10 % (Cultilab, Campinas, Brasil) em estufa umidificada a 37°C e CO<sub>2</sub> 5%.

### 2.2.3 Parasitas

Parasitas da cepa RH de *T. gondii* foram mantidos por meio de inoculação intraperitoneal em camundongos Swiss machos, com peso médio de 25 g e um mês de idade, por meio de passagens seriadas a intervalos de 48-72 horas de um inóculo de aproximadamente 10<sup>6</sup> taquizoítos obtidos do exsudato peritoneal de camundongos previamente infectados (Mineo et al., 1980). Os exsudatos peritoneais foram obtidos por meio de lavagem da cavidade abdominal com solução salina tamponada com fosfatos a 0,01 M (PBS, pH 7,2) estéril e, em seguida, as suspensões parasitárias foram submetidas a uma centrifugação rápida (720 x g, 5 min.) para remover debris celulares do hospedeiro. O sobrenadante foi coletado e lavado por duas vezes (720 x g, 10 min., 4°C) com meio RPMI 1640. O sedimento final da suspensão parasitária foi ressuspenso em 5 mL de meio RPMI 1640 e os parasitos viáveis foram contados em câmara hemocitométrica usando o corante azul de Tripan (0,4%) por exclusão vital.

### 2.2.4 Ensaio de citotoxicidade

A citotoxicidade das neuwiedase foi avaliada pela viabilidade celular de fibroblastos humanos utilizando a análise de MTT como descrito por Mosmann e colaboradores (1983). Fibroblastos (1×10<sup>5</sup> células/poço) foram cultivados em

placas de 96 poços, em triplicata, com meio RPMI completo na ausência ou presença de diluições duplas seriadas de neuwiedase (50 a 0,04 µg/mL) por 24 h a 37°C e 5% CO<sub>2</sub>. Como controle, células foram incubadas somente com meio. Posteriormente, as células foram lavadas com meio e adicionadas de 10 µL de azul de tiazolil (MTT, Sigma Chemical Co.) na concentração de 5 mg/mL em 90 µL de meio RPMI completo, 4 h antes do final da cultura. O sobrenadante foi removido e as partículas insolúveis de coloração roxa produzidas por células viáveis que metabolizaram o MTT foram então solubilizadas com 100 µL/poço de solução 10% de duodecil sulfato de sódio (SDS) e 50% de N, N-dimetil formamida. Após 30 minutos de incubação, a densidade óptica foi determinada a 570 nm em leitor de placa (Titertek Multiskan Plus, Flow Laboratories, McLean, USA). Os resultados foram expressos como a porcentagem de células viáveis em relação ao controle.

A dose citotóxica mediana (dose tóxica de 50% – DT<sub>50</sub>) da neuwiedase foi calculada por extrapolação da curva dose-resposta correspondente em um gráfico log-linear empregando as porções da curva que cruzaram o ponto que corresponde a 50% (Jones-Brando et al., 2006).

#### 2.2.5 Efeito da neuwiedase na infecção por *T. gondii in vitro*

Fibroblastos ( $1 \times 10^5$  células/poço/200 µL) foram cultivados em lamínulas de vidro redondas com 13 mm de diâmetro em placas de 24 poços a 37°C e CO<sub>2</sub>5%. As monocamadas celulares foram então lavadas com meio RPMI e infectadas com taquizoítos da cepa RH de *T. gondii* ( $5 \times 10^5$  parasitas/poço/200 µL) em uma proporção de 5 parasitas por célula (5:1). Após 3 horas de incubação, as células foram novamente lavadas para remover parasitos não aderentes e então tratadas com diluições duplas seriadas de neuwiedase (12 a 0,03 mg/mL). Como controle,

as células infectadas foram incubadas somente com meio de cultura. A placa foi incubada por 24 horas a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Após esse período, os sobrenadantes de cada poço foram coletados em eppendorfs devidamente identificados para posterior dosagem de citocina. Por fim, as células foram lavadas com PBS, fixadas com formalina a 10% tamponada com fosfatos por 2 h e as lamínulas foram então coradas com azul de toluidina a 1% (Sigma Chemical Co.) por 5 (s).

Em outro experimento, parasitas foram pré-tratados por 1 h com as diferentes concentrações de neuwiedase como acima descrito ou somente com meio de cultura (controle) e então incubados com monocamadas de fibroblastos em lamínulas de vidro em uma taxa de infecção de 5:1 (parasitas:células) por 24 h a a 37°C e CO<sub>2</sub> 5%. As células foram lavadas, fixadas e coradas da mesma forma como descrito acima.

As lamínulas foram montadas em lâminas de microscopia e as células foram examinadas em microscopia de luz para avaliação dos parâmetros de índice de infecção (porcentagem de células infectadas por 100 células examinadas) e replicação intracelular do parasita (média do número de parasitas por célula em 100 células infectadas) (Oliveira et al., 2006). Resultados foram expressos como a porcentagem de inibição de cada droga em relação ao controle, que foi estabelecido como 100% de infecção. A dose inibitória mediana (dose inibitória 50% – DI<sub>50</sub>) da neuwiedase foi também calculada como descrito anteriormente para DT<sub>50</sub>. Além disso, foi também calculado o Índice Terapêutico (IT) de acordo com a seguinte fórmula:  $IT = DT_{50} / DI_{50}$  (Jones-Brando et al., 2006).

#### 2.2.6 Determinação da produção de citocinas e quimiocinas

Os sobrendantes de cultura previamente coletados foram centrifugados a 4°C por 5 min. e armazenados em ultrafreezer -70°C até o momento da dosagem de citocinas e quimiocinas. A concentração de TNF- $\alpha$ , IL-10 e IL-8 foi determinada pela técnica de ELISA sanduíche de acordo com as instruções do fabricante (BD Bioscience) por meio da comparação com uma curva padrão construída com a respectiva citocina ou quimiocina humana recombinante.

### 2.2.7 Análise estatística

A análise estatística e a construção dos gráficos referentes à inibição da invasão e da proliferação intracelular de parasita foram realizadas utilizando o programa GraphPad Prism versão 4.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, USA). Os gráficos e as análises estatísticas referentes aos níveis de citocinas e quimiocinas foram realizados utilizando o programa Statview for Windows versão 4.57 (Abacus Concepts, Inc.). O teste de Kruskal-Wallis foi utilizado para comparar os diferentes grupos e o teste de Mann-Whitney para comparar diferenças entre dois grupos ( $p < 0,05$ )

## 2.3. Resultados

### 2.3.1 Atividade citotóxica de neuwiedase sobre fibroblastos humanos

A porcentagem de viabilidade celular de fibroblastos humanos (HFF) na presença de diferentes concentrações de neuwiedase foi determinada. Foi observada a Dose Tóxica 50% (DT<sub>50</sub>) de 12,478  $\mu\text{g/mL}$  de neuwiedase. Esses resultados são mostrados na Figura 1.

### 2.3.2 Tratamento com neuwiedase de fibroblastos humanos previamente infectados com *T. gondii*

O tratamento com diferentes concentrações de neuwiedase sobre fibroblastos humanos previamente infectados com *T. gondii* apresentou uma curva dose-resposta com relação à invasão dos parasitas na célula, chegando a alcançar taxas de 71 % de inibição da infecção. (Figura 2A). Nessas condições, o tratamento com neuwiedase não apresentou efeitos significativos quanto à multiplicação intracelular do parasita. (Figura 3A).

### 2.3.3 Pré-tratamento de taquizoítos de *T. gondii* com neuwiedase antes da infecção de fibroblastos humanos

O pré-tratamento dos taquizoítos de *T. gondii* com neuwiedase apresentou efeito em ambos os parâmetros analisados. Nessa condição, apresentou uma curva dose-resposta que alcançou taxas de cerca de 61 % de inibição para índice de infecção e 58 % de inibição para multiplicação intracelular. (Figura 2B e 3B). Fotomicrografia relativa ao ensaio está mostrada na figura 4.

### 2.3.4. Cálculos da dose inibitória de 50 % (DI<sub>50</sub>) e Índice terapêutico (IT)

Usando como referência os resultados de citotoxicidade de neuwiedase sobre fibroblastos humanos, as taxas de inibição da infecção por *T. gondii* e as taxas de inibição da replicação intracelular do parasita foi possível calcular a dose tóxica de 50% (DT<sub>50</sub>), a dose inibitória de 50% (DI<sub>50</sub>) e o correspondente índice terapêutico (IT) para a neuwiedase nas duas diferentes condições de tratamento. Esses valores estão apresentados na Tabela 1.



### 2.3.5 Determinação da produção de citocinas e quimiocinas

Os sobrenadantes recolhidos na cultura de fibroblastos previamente infectados com *T. gondii* e tratados com neuwiedase foram submetidos a ensaios de determinação da concentração de citocinas e quimiocinas. Foi analisada a presença das citocinas IL-10 e TNF- $\alpha$  e da quimiocina IL-8. A concentração de IL-10 e TNF- $\alpha$  nos sobrenadantes coletados estava abaixo do limite de detecção dos seus respectivos testes comerciais. Os níveis de IL-8 obtidos mostraram-se dose-dependentes em relação à concentração de neuwiedase até a dose de 3  $\mu\text{g/mL}$ . Após essa concentração, as doses avaliadas não diferiram entre si. (Figura 5).

## 2.4 Discussão

A neuwiedase apresentou efeitos de inibição do índice de infecção sobre ambos os tipos de tratamento avaliados. A dose inibitória de 50 % do índice de infecção por *T. gondii* em tratamento de células de fibroblastos humanos (HFF) infectados antes do tratamento com neuwiedase foi de 4,84  $\mu\text{g/mL}$  e o respectivo índice terapêutico de 2,578. Quanto à multiplicação celular a dose inibitória de 50 % foi de 46,560  $\mu\text{g/mL}$  e conseqüentemente o índice terapêutico nessa condição de tratamento apresentou um valor de 0,268 que é considerado baixo.

Esses resultados sugerem que, sob essa condição de tratamento, a neuwiedase atua sobre a invasão de novas células e parece não exercer efeito sobre o parasita intracelular. A replicação dos taquizoítos dentro das células ocorre em um tempo de 6 a 8 horas até o rompimento da célula e a infecção de células vizinhas (Black e Boothroyd, 2000). Aparentemente a neuwiedase atua sobre os parasitas no momento em que ocorre a lise celular e estes são liberados

para infectarem os fibroblastos circundantes. Nesta fase, a neuwiedase pode atuar na degradação de proteínas expressas pelos fibroblastos responsáveis pela formação da monocamada e adesão das células, especialmente a laminina, que podem auxiliar no processo de invasão do parasita. A laminina é a glicoproteína mais abundante em membranas basais e suas interações com moléculas de superfícies celulares e receptores promovem adesão célula-célula, migração e diferenciação celular (Furtado et al., 1992a). Rodrigues e colaboradores, em 2000, mostraram que a neuwiedase degrada alguns componentes de matriz extracelular, como laminina, colágeno tipo I e fibronectina. Em 1992, Furtado e colaboradores, já havia reportado que a laminina da célula hospedeira medeia a ligação de taquizoítos sobre fibroblastos humanos (HFF) (Furtado et al., 1992b). O *T. gondii* é capaz de se ligar a laminina e usá-la como uma ponte para os receptores de laminina encontrados na superfície da célula hospedeira (Black e Boothroyd, 2000). Os taquizoítos reconhecem múltiplos receptores de laminina durante a fixação a diferentes células alvo (Furtado et al., 1992a).

Desta forma, a ação da neuwiedase sobre a laminina pode impedir com que a mesma seja utilizada pelo parasita como um intermediário para acessar os receptores de laminina presentes na membrana das células hospedeiras, diminuindo assim o índice de infecção nos fibroblastos.

O pré-tratamento do taquizoíto com a neuwiedase e posterior infecção também diminuiu o índice de infecção pelo parasita em relação ao controle e inibiu a multiplicação intracelular. Os valores da dose inibitória de 50 % nesse caso foram 7,703 µg/mL para a invasão e 3,240 µg/mL para a replicação intracelular e os respectivos índices terapêuticos foram 1,620 e 3,851.

A comparação entre as duas condições de tratamento permite afirmar que o mais efetivo quanto à inibição da infecção foi o tratamento de células previamente infectadas, o que se justifica por um maior índice terapêutico, 2,578 enquanto no pré-tratamento foi 1,620. Quanto à inibição da multiplicação intracelular, o pré-tratamento do taquizoíto com neuwiedase foi mais efetivo, apresentando um índice terapêutico de 3,851 em contraste ao baixo valor encontrado no tratamento de células previamente infectadas (0,268).

Segundo Dubey et al. (1998) e Black e Boothroyd (2000) após infectar a célula hospedeira o taquizoíto fica envolto por um vacúolo parasitóforo, que é constituído em grande parte por material membranoso proveniente do parasita. Durante o processo de endodiogenia, que é a reprodução assexuada através da qual os taquizoítos se multiplicam na célula hospedeira, o plasmalema original do taquizoíto invasor é utilizado para envolver as células filhas geradas. Quando o taquizoíto é pré-tratado com neuwiedase antes de infectar a célula, sua membrana é submetida a ação proteolítica desta enzima. Com isso a membrana pode perder a integridade de algumas proteínas, o que pode ter prejudicado tanto a atividade funcional do vacúolo quanto a formação do plasmalema das células filhas e assim, diminuir a multiplicação intracelular.

O *Toxoplasma* expressa ao menos cinco proteínas transmembranas (Carruthers e Boothroyd, 2007) e uma família de proteínas relacionadas a antígenos de superfície (SAGs) que constitui a maior parte dos componentes de superfície desse protozoário (Black e Boothroyd, 2000). A SAG1 é a mais abundante dessas proteínas e um importante ligante do parasita envolvido na invasão à célula hospedeira (Mineo e Kasper, 1994). Proteínas secretadas por organelas dos taquizoítos desempenham papéis centrais nos processos de

motilidade e invasão (Carruthers, 2006). Todas essas proteínas citadas podem ser alvos da atividade proteolítica da neuwiedase e a perda de função dessas proteínas pode ser um dos prováveis mecanismos pelo qual a neuwiedase reduz a taxa de infecção por *T. gondii*.

No ensaio de detecção de citocinas e quimiocinas nos sobrenadantes da cultura de fibroblastos infectados e posteriormente tratados com neuwiedase foi possível detectar uma elevação dose dependente na concentração da quimiocina IL-8. As outras citocinas pesquisadas, TNF- $\alpha$  e IL-10, não foram produzidas ou se encontravam em concentrações abaixo do limite de detecção dos kits utilizados. A IL-8 é um potente agente quimiotático e pode atrair neutrófilos e leucócitos sob diferentes estímulos (Hayashi et al., 2003). A liberação da IL-8 por fibroblastos, nessa condição de tratamento, pode ser, provavelmente, uma tentativa de recrutamento de células efectoras do sistema imune.

Em um recente trabalho de Tempone e colaboradores (2007) foi demonstrado, “*in vitro*”, que as secreções de *Phyllomedusa distincta* e *Corythomantis greeningi* exercem potente atividade contra *Toxoplasma gondii*. Secreções de outras espécies de anfíbios mostraram-se eficazes contra os agentes etiológicos da doença de Chagas e da leishmaniose visceral. Portanto, a identificação e isolamento de peptídeos bioativos constituintes desses venenos é bastante importante.

É necessário avaliar a ação da neuwiedase através de outros métodos, como imunomarcação e eletromicrografia, que podem permitir a identificação de possíveis receptores e proteínas que podem ser substratos para essa enzima. Isso ajudaria a encontrar alguma estrutura que pode ser alvo potencial de ataque na busca por novas drogas ou elucidar mecanismos bioquímicos da infecção que

possam servir como informações para o desenho de moléculas farmacologicamente ativas. Considerando que a terapia da toxoplasmose é limitada por resistência dos parasitas, efeitos colaterais e toxicidade ao hospedeiro (Montoya e Liesenfeld, 2004; Carruthers, 2006; Martins-Duarte et al., 2006; Petersen, 2007), a pesquisa por novos princípios ativos e o desenvolvimento de novos fármacos é essencial.

As peçonhas brutas das serpentes de *Bothrops moojeni*, *Crotalus durissus terrificus*–Cdt, *Crotalus durissus cascavella*–Cdca e *Crotalus durissus collilineatus*–Cdcoll mostraram possuir eficiente atividade anti-leishmania (Tempone et al., 2001; Passero et al., 2007). Assim, toxinas animais podem ser boas fontes de substâncias com ação antiparasitária e a fauna brasileira é importante devido a grande diversidade de animais peçonhentos, como répteis e anfíbios, a partir dos quais são extraídas essas toxinas. Os efeitos da neuwiedase expostos aqui podem servir como ferramentas para a elaboração de novos agentes terapêuticos sintéticos.

## **2.5 Agradecimentos**

Os autores agradecem a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro.

## **2.6 Referências**

- Black, M. E., Boothroyd, J. C., 2000. Lytic Cycle of *Toxoplasma gondii*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 64, 607-623.
- Bowie, W. R., King, A. S., Werker, D. H. et al., 1997. Outbreak of toxoplasmosis associated with municipal drinking water. *The Lancet* 350, 173-177.
- Carruthers, V. B., Boothroyd, J. C., 2007. Pulling together: an integrated model of *Toxoplasma* cell invasion. *Current Opinion in Microbiology* 10, 83-89.
- Carruthers, V. B., 2006. Proteolysis and *Toxoplasma* invasion. *International Journal for Parasitology*, 36, 595-600.
- Dubey, J. P., Beattie, C. P., 1988. *Toxoplasmosis of animals and man*. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Ferreira, R. A., Oliveira, A. B., Ribeiro, M. F. B., Tafurl, W.L., Vitor, R. W. A., 2006. *Toxoplasma gondii*: *In vitro* and *in vivo* activities of the hydroxynaphthoquinone 2-hydroxy-3-(1'-propen-3-phenyl)-1,4-naphthoquinone alone or combined with sulfadiazine. *Experimental Parasitology*, 113, 25-129.
- Furtado, G. C., Slowik, M., Kleinman, H. K., Joiner, K. A., 1992. Laminin enhances binding of *Toxoplasma gondii* tachyzoites to J1774 murine macrophage cells. *Infection and Immunity*, 6, 2337-2342.
- Furtado, G. C., Cao, Y., Joiner, K. A., 1992. Laminin on *Toxoplasma gondii* mediates parasite binding to the  $\beta 1$  integrin receptor  $\alpha 6 \beta 1$  on human foreskin fibroblasts and Chinese hamster ovary cells. *Infection and Immunity*, 11, 4925-4931.
- Goodman & Gilman, 2003. *As bases farmacológicas da terapêutica*; 10<sup>a</sup> ed. Editora McGrawHill, Rio de Janeiro.
- Hayashi, F., Means, T. K., Luster, A. D., 2003. Toll-like receptors stimulate human neutrophil function. *Blood* 102 (7), 2660-2669.

- Hill, D. E., Chirukandoth, S., Dubey, J. P., 2005. Biology and epidemiology of *Toxoplasma gondii* in man and animals. *Animal Healthy Research Reviews* 6, 41-61.
- Hill, D., Dubey, J. P., 2002. *Toxoplasma gondii*: transmission, diagnosis and prevention. *Clinical Microbiology and Infection* 8, 634-640.
- Ho-Yen, D. O., 1992. Clinical features. In: Ho-Yen, D. O., Joss, A. W. L. (Ed.) *Human Toxoplasmosis*. Oxford: Oxford University Press, p. 56-78.
- Jones-brando, L., D'Angelo, J., Posner, G. H., Yolken, R., 2006. *In vitro* inhibition of *Toxoplasma gondii* by four new derivatives of artemisinin. *Antimicrobial Agents Chemotherapy* 50, 4206-4208.
- Joss, A. W. L. In: Ho-Yen, D. O., Joss, A. W. L. (Ed.), 1998. *Human toxoplasmosis*, v. 120, Oxford University Press, New York, p. 5.
- Kim, Y. A., Sharon, A.; Chu, C. K., Rais, R. H., Safarjani, O. N. A., Naguib, F. M. N., Kounl, M. H., 2007. Synthesis, biological evaluation and molecular modeling studies of N<sup>6</sup>-benzyladenosine analogues as potential anti-toxoplasma agents. *Biochemical Pharmacology* 73, 1558-1572.
- Koehn, F. E., Carter, G. T., 2005. The evolving role of natural products in drug Discovery. *Nature review. Drug Discovery*. 4, 206-220.
- Lewis, R. J., Garcia, M. L., 2003. Therapeutic potential of venom peptides. *Nature reviews. Drug Discovery* 2, 790-802.
- Martins-Duarte, E. S., Urbina, J. A., Souza, W., Vommaro, R. C., 2006. Antiproliferative activities of two novel quinuclidine inhibitors against *Toxoplasma gondii* tachyzoites *in vitro*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 58, 59-65.

Mineo, J. R., Camargo, M. E., Ferreira, A. W., 1980. Enzyme-linked immunosorbent assay for antibodies to *Toxoplasma gondii* polysaccharides in human toxoplasmosis. *Infection and Immunity* 27, 283-287.

Mineo, J. R., Kasper, L. H., 1994. Attachment of *Toxoplasma gondii* to host cells involves Major Sufaces Protein, SAG1 (P30). *Experimental Parasitology* 79, 11-20.

Montoya, J. G., Liesenfeld, O., 2004. Toxoplasmosis. *The Lancet*, 363, 1965-1976.

Mosmann, T., 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods* 65, 55–63.

Oliveira, J.G., Silva, N.M., Santos, A.A., Souza, M.A., Ferreira, G.L., Mineo, J.R., Ferro, E.A., 2006. BeWo trophoblasts are unable to control replication of *Toxoplasma gondii*, even in the presence of exogenous IFN-gamma. *Placenta* 27, 691-8.

Passero, L. F. D., Tomokane, T. Y., Corbett, C. E. P., Laurentl, M. D., Toyama, M. H., 2007. Comparative studies of the anti-leishmanial activity of *three Crotalus durissus ssp.* venoms. *Parasitology Research* 101, 1365-1371.

Petersen, E., 2007. Toxoplasmosis. *Seminars in Fetal & Neonatal Medicine* 12,214-223.

Petersen, E., Schimidt, D. R., 2003. Sulfadiazine and pyrimethamine in the postnatal treatment of congenital toxoplasmosis: what are the options? *Expert Review of Anti-infective Therapy* 1, 175-182.

Rodrigues, V. M., Soares, A. M., Andrião-Escarso, S. H., Franceschi, A. M., Rucavado, A., Gutiérrez , J. M.; Giglio, J. R., 2001. Pathological alterations



induced by neuwiedase, a metalloproteinase isolated from *Bothrops neuwiedi* snake venom. *Biochimie* 83, 471-479.

Rodrigues, V. M., Soares, A. M., Guerra-Sá, R., Rodrigues, V., Fontes, M. R. M., Giglio, J. R., 2000. Structural and functional characterization of Neuwiedase, a nonhemorrhagic fibrin(ogen)olytic metalloprotease from *Bothrops neuwiedi* snake venom. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 381, 213-224.

Sharif, M., Ziaei, H., Daryani, A., Ajami, A., 2007. Seroepidemiological study of toxoplasmosis in intellectual disability children in rehabilitation centers of northern Iran. *Research in Developmental Disabilities* 28, 219-224.

Subauste, C. S., Remington, J. S., 1993. Immunity to *Toxoplasma gondii*. *Current Opinion in Immunology* 5 532-537.

Tempone, A. G., Andrade, H. F., Spencer, P. J., Lourenço, C. O., Rogero, J. R., Nascimento, N., 2001. *Bothrops moojeni* venom kills *Leishmania* spp. With hydrogen peroxide generated by its L-Amino acid oxidase., 2001. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 280, 620-624.

Tempone, A. G., Melhem, M. S. C., Prado, F. O., Motoie, G., Hiramoto, R. M., Antoniazzi, M. M., Haddad, C. F. B., Jared, C., 2007. Amphibian secretions for drug discovery studies: a search for new antiparasitic and antifungal compounds. *Letters in Drug Design & Discovery* 4, 67-73.

Tenter, A. M., Heckeroth, A. R., Weiss, L. M., 2000. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *International Journal for Parasitology* 30, 1217-1258.

Wilder, H. C., 1952. Chorioretinitis in adults. A.M.A. *Archives of Ophthalmology* 48,127-136.

## Figuras e tabelas

Figura 1:

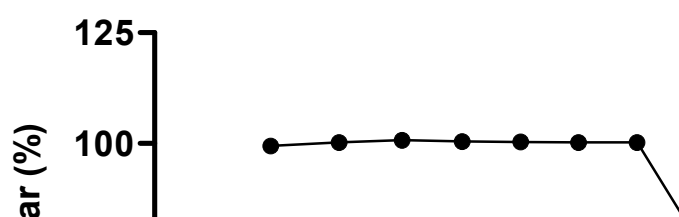


Figura 2

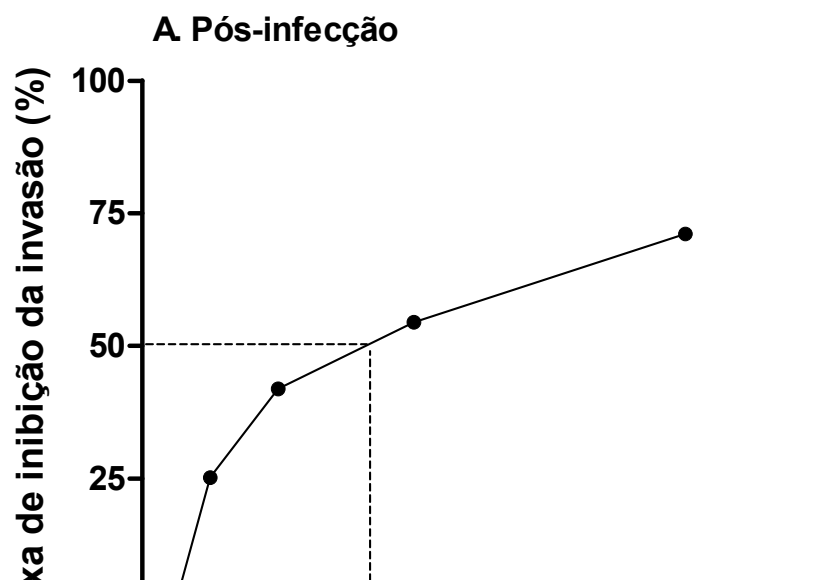
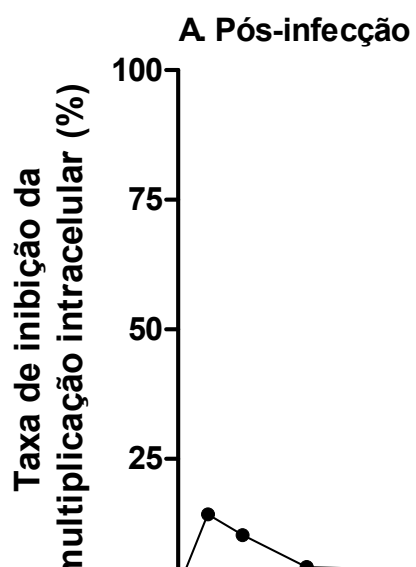


Figura 3:



**Legendas das figuras:**

**Figura 1. Atividade citotóxica da neuwiedase *in vitro* determinada por ensaios de MTT**

Fibroblastos humanos foram cultivados em placas de cultura de 96 poços na ausência (controle) ou presença de diferentes concentrações de neuwiedase (50 a 0,04 µg/mL) por 24 h. Os resultados foram expressos como a porcentagem de

células viáveis em relação ao controle. A linha tracejada mostra a dose tóxica para 50% das células.

### **Figura 2. Efeitos do tratamento com neuwiedase quanto à inibição da invasão**

O efeito da neuwiedase sob diferentes condições de tratamento foi avaliado quanto à inibição da invasão de *T. gondii* em células de fibroblastos humanos (HFF) em relação ao controle. A figura A mostra os resultados do tratamento posterior à infecção e a figura B os efeitos do pré-tratamento dos taquizoítos com neuwiedase. Os resultados foram expressos como a porcentagem de inibição da invasão por *T. gondii* em relação ao controle. A linha tracejada mostra a dose inibitória de 50% de inibição da invasão em relação ao controle.

### **Figura 3. Efeitos do tratamento com neuwiedase quanto à inibição da multiplicação intracelular**

O efeito da neuwiedase sob diferentes condições de tratamento foi avaliado quanto à inibição da multiplicação intracelular de *T. gondii* em células de fibroblastos humanos (HFF) em relação ao controle. A figura A mostra os resultados do tratamento posterior à infecção e a figura B os efeitos do pré-tratamento dos taquizoítos com neuwiedase. Os resultados foram expressos como a porcentagem de inibição da multiplicação intracelular de *T. gondii* em relação ao controle. A linha tracejada mostra a dose inibitória de 50% de inibição da multiplicação em relação ao controle.

**Figura 4:**  
Fotomicrografia de fibroblastos infectados com *T. gondii* (seta pontilhada), fibroblastos não infectados (cabeça de seta) e taquizoítos dentro do fibroblasto (seta inteira) em um aumento de 1000 x.

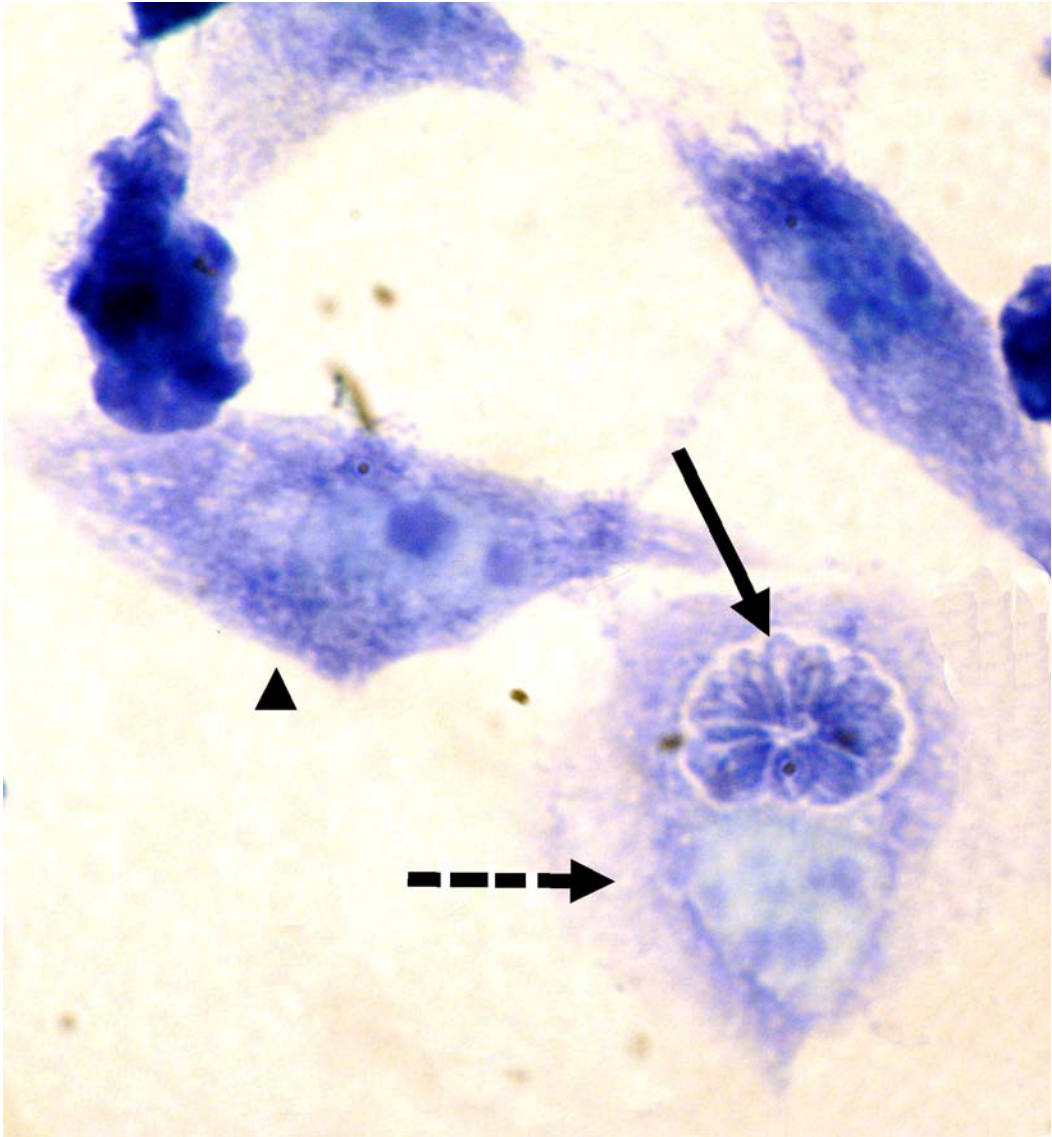
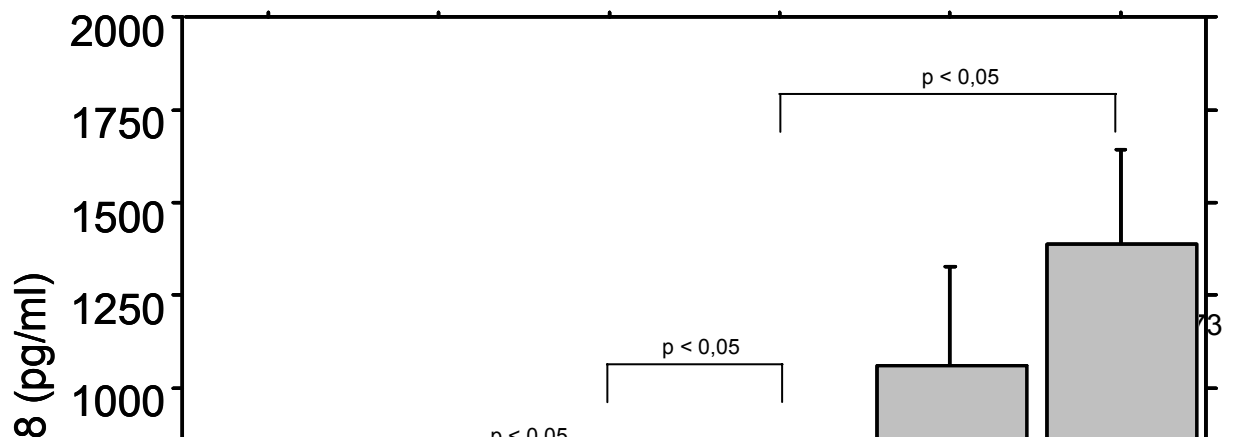


Figura 5:





**Figura 5. Produção de IL-8 por fibroblastos humanos (HFF) previamente infectados com *T. gondii* e tratados com neuwiedase**

Os sobrenadantes da cultura de fibroblastos humanos (HFF) previamente infectados com *T. gondii* e tratados com diferentes concentrações de neuwiedase foram coletados e utilizados em ensaios de ELISA para detecção da quimiocina IL-8. Os resultados foram expressos em pg/mL e as diferenças estatisticamente significantes estão indicadas como  $p < 0,05$ .

**Tabela 1.** Inibição *in vitro* da infecção por *Toxoplasma gondii* em fibroblastos humanos sob diferentes condições de tratamento com a toxina Neuwiedase isolada da peçonha da serpente *Bothrops pauloensis*.

Tratamento	DT <sub>50</sub> <sup>c</sup> (µg/mL)	DI <sub>50</sub> <sup>d</sup> (µg/mL)		IT <sup>e</sup>	
		Invasão	Replicação	Invasão	Replicação

Pré-infecção <sup>a</sup>	12,478	7,703	3,240	1,620	3,851
Pós- infecção <sup>b</sup>	12,478	4,84	46,560 <sup>f</sup>	2,578	0,268

<sup>a</sup> Tratamento de taquizoítas de *T. gondii* da cepa RH com diferentes concentrações da toxina Neuwiedase (diluições duplas seriadas de 12 a 0,7 µg/mL) antes da infecção de fibroblastos humanos;

<sup>b</sup> Tratamento de fibroblastos humanos com diferentes concentrações da toxina Neuwiedase (diluições duplas seriadas de 12 a 0,7 µg/mL) após a infecção por taquizoítas de *T. gondii*;

<sup>c</sup> DT<sub>50</sub>: Dose tóxica de 50% em fibroblastos humanos;

<sup>d</sup> DI<sub>50</sub> : Dose inibitória de 50% em relação aos parâmetros de invasão e replicação intracelular do parasito;

<sup>e</sup>IT: Índice terapêutico = DT<sub>50</sub>/DI<sub>50</sub>

<sup>f</sup> Calculado como dado extrapolado acima da curva.

# Capítulo 3

**Neuwiedase estimula a produção *in vitro* de citocinas e quimiocinas inflamatórias por células mononucleares do sangue periférico humano.**

Luciana Machado Bastos<sup>a</sup>, Carlos Ueira Vieira<sup>b</sup>, Robson José de Oliveira Júnior<sup>a</sup>, Maria Inês Homs-Brandeburgo<sup>a</sup>, Veridiana de Melo Rodrigues<sup>a</sup>, David Nascimento Silva Teixeira<sup>b</sup>, Amélia Hamaguchi<sup>a</sup>.

<sup>a</sup>Instituto de Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia- Uberlândia-MG, Brazil.

<sup>b</sup> Disciplina de Laboratório Clínico, Departamento de Clínica Médica, Universidade Federal do Triângulo Mineiro- Uberaba-MG, Brazil.

## **Resumo**

A liberação de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias (IL-12, TNF- $\alpha$  e IL-8) e da citocina antiinflamatória (IL-10) por células mononucleares do sangue periférico humano (PBMC) foi avaliada após estímulo com neuwiedase, uma metaloprotease Zn<sup>2+</sup> dependente isolada da peçonha de *Bothrops pauloensis*. Inicialmente, através do ensaio de metabolização do MTT, verificamos que a neuwiedase não afetou a viabilidade celular das PBMCs nas diferentes concentrações testadas (3, 6 e 12  $\mu$ g/mL). Os sobrenadantes de PBMCs cultivadas na presença de neuwiedase foram coletados e submetidos ao ensaio de ELISA sanduíche para quantificação da produção de citocinas e quimiocinas. Sob estímulo da neuwiedase, as células mononucleares aumentaram de forma significativa a produção de IL-12p40, IL-8 e TNF- $\alpha$  e não houve alteração na produção de IL-10 em relação aos controles não estimulados. Esse estudo confirma o efeito inflamatório da neuwiedase envolvendo a liberação de mediadores pró-inflamatórios, provavelmente contribuindo para o dano local severo induzido pelo envenenamento por *Bothrops pauloensis*.

**Palavras chaves:** neuwiedase; citocinas; quimiocinas, células mononucleares; toxinas de serpente; metaloproteases.

## **Abstract**

The release of pro-inflammatory cytokines and chemokine (IL-12, TNF- $\alpha$  and IL-8) and anti-inflammatory cytokine (IL-10) from human peripheral blood mononuclear cells (PBMC) was evaluated after exposure to neuwiedase, a Zn<sup>2+</sup> dependent metalloprotease isolated from *Bothrops pauloensis* venom. Initially, using the MTT metabolization assay, we show that in all concentrations tested (3, 6 e 12  $\mu$ g/mL), neuwiedase did not affect PBMCs viability. Supernatants of PBMC culture in presence of neuwiedase were collected and cytokine and chemokine levels were determined by sandwich ELISA. Under neuwiedase stimulation, PBMCs significantly increased the production of IL-12p40, IL-8 and TNF- $\alpha$  but not IL-10 production compared cells to not stimulated with neuwiedase. This study confirms the inflammatory properties of neuwiedase involving the liberation of pro-inflammatory mediators, probably contributing to the severe local damage induced by the *Bothrops pauloensis* venom.

**Key words:** neuwiedase; cytokines; chemokine; peripheral blood mononuclear cells, snake venoms; metalloproteinases.

### 3.1. Introdução

#### 3.1. Introdução

A neuwiedase é uma metaloprotease isolada da peçonha de *Bothrops pauloensis*, pertencente à classe P-I, a qual compreende proteínas que possuem somente o domínio metaloprotease. Ela representa aproximadamente 4,5% (p/p) do veneno bruto dessecado, sua massa molecular é de aproximadamente 20 kDa e seu ponto isoelétrico (pI) é 5,9 (Rodrigues et al., 2000).

A neuwiedase é isenta de atividade hemorrágica em testes sob a pele, mas induz hemorragia quando aplicada no músculo cremaster de camundongo em experimentos por microscopia intravital (Baldo et al., 2007) e causa hemorragia pulmonar quando injetada por via intravenosa em doses acima de 5 µg/mL (Rodrigues et al., 2001). Quando administrada via intramuscular em camundongos, a neuwiedase induz mionecrose concomitante com reação inflamatória caracterizada pela presença de infiltrado de leucócitos (Rodrigues et al., 2001).

Peçonhas de serpente contêm uma mistura de enzimas capazes de mediar direta ou indiretamente processos inflamatórios e hemorrágicos. O mecanismo do dano tecidual local no envenenamento por serpentes envolve a ativação de resposta imune celular, no qual uma cascata de eventos é geralmente iniciada por macrófagos teciduais e monócitos sanguíneos (Voronov et al., 1999; Clissa et al., 2001). A maioria das células mononucleares do sangue periférico são basicamente os monócitos e linfócitos. Os monócitos passam por um processo de maturação e podem se diferenciar em macrófagos. Essas células são responsáveis pela produção de citocinas e quimiocinas e recrutamento de outras células inflamatórias.

A inflamação aguda e crônica é caracterizada por alguns processos fundamentais que incluem exsudação de proteínas plasmáticas, recrutamento de leucócitos, ativação de células e liberação de mediadores inflamatórios no plasma (Manicone e McGuire, 2008). A migração de leucócitos é um evento chave na inflamação, um mecanismo de defesa contra alguma injúria ou agente infeccioso. Durante a fase aguda da inflamação, os neutrófilos são as primeiras células a se acumularem no tecido (Ryan e Majino, 1977). O recrutamento de leucócitos para os tecidos é um processo realizado em múltiplos passos, os quais são mediados por três principais classes de moléculas de adesão (integrinas, selectinas e imunoglobulinas) expressas tanto por leucócitos como por células endoteliais (Bevilacqua e Nelson, 1993; Fernandes et al., 2006).

Além de induzirem hemorragia, mionecrose e patologias de pele, as metaloproteases de serpente desempenham um relevante papel na complexa e multifatorial resposta inflamatória característica de envenenamentos ofídicos (Gutiérrez e Rucavado, 2000). Este trabalho reporta os efeitos da neuwiedase sobre a produção *in vitro* de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias (IL-10, TNF- $\alpha$  e IL-8) e antiinflamatórias (IL-10) por células mononucleares do sangue periférico humano. O perfil de citocinas e quimiocinas encontrado confirma o papel da neuwiedase na ativação de mecanismos pró-inflamatórios, contribuindo para o dano local severo induzido pelo envenenamento por *Bothrops pauloensis*.

## 3.2. Material e métodos

### 3.2.1 Obtenção da neuwiedase

O isolamento da neuwiedase foi realizado de acordo com metodologia descrita por Rodrigues, et al (2000), com algumas modificações. A peçonha bruta de *Bothrops pauloensis* foi obtida junta ao serpentário Pentapharm do Brasil Comércio e Exportação Ltda. Uma amostra de 200mg do veneno de *B. pauloensis* (Bp) foi ressuspensa em 2 mL de tampão bicarbonato de amônio 0,05 M, pH 7,8, centrifugada a 480 X g durante 10 minutos a 4°C e o sobrenadante límpido obtido foi aplicado em uma coluna de troca iônica contendo a resina CM-Sepharose (2,0 x 20,0 cm), previamente equilibrada com o mesmo tampão.

As proteínas foram eluídas em temperatura ambiente com um gradiente convexo de concentração de bicarbonato de amônio (0,05 - 0,5 M), pH 7,8. Frações de 3,0 mL/tubo foram coletadas num fluxo de 20mL/hora por um coletor de frações REDIFRAC (Amersham Biosciences do Brasil Ltda). Cada fração coletada foi monitorada por absorvância a 280nm em um espectrofotômetro SPEKOL UV VIS (Zeiss). Após traçar o cromatograma as amostras de proteínas foram reunidas em "pools", liofilizadas e armazenadas a -20° C. Foram obtidas cinco frações denominadas de CM1 a CM5.

A fração CM2 (10mg) obtida da cromatografia de troca iônica em CM-Sepharose foi dissolvida em 1mL de tampão Tris-HCl 10mM pH 8,5 + NaCl 4M, sendo posteriormente aplicada em uma coluna de afinidade (1,0 x 7,0cm) contendo a resina Phenyl-Sepharose CL-4B, equilibrada com o mesmo tampão.

As amostras foram eluídas a temperatura ambiente iniciando-se com o tampão de equilíbrio (Tris-HCl 10mM pH 8,5 + NaCl 4M) e posteriormente com soluções decrescentes de concentração molar de NaCl (3M, 2M, 1M, 0,5M),



seguindo com Tris-HCl 10mM pH 8,5 e finalmente com água destilada. Foram coletadas frações de 2,5 mL/tubo num fluxo de 20mL/hora no coletor de frações REDIFRAC (Amersham Biosciences do Brasil Ltda). A eluição de cada fração foi monitorada por absorvância à 280nm em um espectrofotômetro SPEKOL UV VIS (Zeiss). Após traçar o cromatograma as amostras de proteínas foram reunidas em “pools” e a fração correspondente a neuwiedase foi submetida a um sistema de ultrafiltração (AMICON YM 10) lavando-se pelo menos duas vezes com água destilada e posteriormente foi liofilizada e armazenada a -20° C.

### 3.2.2 Eletroforese em gel de poliacrilamida com agentes desnaturantes

As eletroforeses em gel de poliacrilamida a 14% com agentes desnaturantes (SDS) foram realizadas conforme a técnica descrita por Laemmli, (1970).

Para o gel de separação foram utilizadas as seguintes soluções: Tris-HCl 2M pH 8,8 , Acrilamida:Bis 30:0,8, Temed 1% e persulfato de amônio 1%. Enquanto que, para o gel de empilhamento foram utilizados: Tris-HCl 2M pH 6,8 , Acrilamida:Bis 30:08 , Temed 1% e persulfato de amônio 1%. A solução de trizma base 0,025M, glicina 0,192M e SDS 0,1% pH 8,3 foi utilizada como tampão para o cátodo e a mesma solução para o ânodo. As amostras (CM2 e neuwiedase isolada) contendo 10µg de proteínas foram dissolvidas em 20µL do tampão STOP (Tris-HCl 0,06M pH 6,8, Azul de Bromofenol 0,001%, Glicerol 10% e 10µL de β-mercaptoetanol 10%). Em seguida, as amostras foram aquecidas por 3 minutos a 100°C. A eletroforese foi conduzida a 20mA de corrente, por aproximadamente 50 minutos, até o indicador azul de bromofenol alcançar o final do gel.

Terminada a migração o gel foi submetido em coloração por prata seguindo um protocolo da Pharmacia Biotech. O peso molecular foi estimado pelo padrão de peso molecular 7L (Sigma), contendo as seguintes proteínas: soroalbumina bovina (66kDa), ovoalbumina (45kDa), gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase (36kDa), anidrase carbônica (29kDa), tripsinogênio (24kDa), inibidor de tripsina (20.1kDa),  $\alpha$ -lactoalbumina (14.4kDa). (Figura 2)

### 3.2.3 Obtenção e cultivo de células monucleares do sangue periférico (PBMC)

As PBMCs foram isoladas à partir de sangue periférico coletado de doadores voluntários saudáveis maiores de 18 anos com a aprovação do projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (Protocolo de aprovação nº 1079). O sangue venoso periférico (18 mL) previamente coletado foi cuidadosamente pipetado sobre 12,5 mL de uma solução de ficoll-hypaque em tubos plásticos cônicos (FALCON) de 50 mL. Os tubos foram centrifugados a 400 x g por 30 minutos a 18°C. Ao final da centrifugação, obteve-se um anel de células mononucleares na interface entre a solução de ficoll e o plasma. O plasma foi retirado cuidadosamente e o anel de células coletado com o auxílio de uma pipeta Pasteur e transferido para um tubo cônico de 50,0 mL (FALCON). O excesso de ficoll foi removido por centrifugação lavando-se as células por 3 vezes com 30,0 mL de MEM (Minimal Essential Médium) em cada lavagem, a 4°C e a velocidade de 294 g por minuto. As células são finalmente ressuspensas em 5,0 mL de RPMI contendo Hepes 4,75 g/L, 10% de soro fetal bovino inativado, L-glutamina 1% e gentamicina 40  $\mu$ g/mL. A quantidade de células obtidas foi determinada por contagem em câmara de Neubauer.

Todos os procedimentos foram realizados em condições estéreis utilizando-se capela de fluxo laminar, com exceção da contagem de células.

#### 3.2.4 Viabilidade celular

A citotoxicidade das neuwiedase foi avaliada pela viabilidade celular de células mononucleares do sangue periférico humano (PBMC) utilizando a análise de redução do MTT como descrito por Mosmann e colaboradores (1983). Células mononucleares do sangue periférico humano ( $1 \times 10^5$  células/poço) foram cultivadas em placas de 96 poços, em triplicata, com meio RPMI completo na ausência ou presença de neuwiedase nas concentrações 3, 6 e 12  $\mu\text{g/mL}$  por 24 h a  $37^\circ\text{C}$  e  $\text{CO}_2$  5%. Como controle, células foram incubadas somente com meio. Posteriormente, as células foram lavadas com meio e adicionadas de 10  $\mu\text{L}$  de azul de tiazolil (MTT, Sigma Chemical Co.) na concentração de 5  $\text{mg/mL}$  em 90  $\mu\text{L}$  de meio RPMI completo, 4 h antes do final da cultura. O sobrenadante foi removido e as partículas insolúveis de coloração roxa produzidas por células viáveis que metabolizaram o MTT foram então solubilizadas com 100  $\mu\text{L}$ /poço de solução 10% de duodecil sulfato de sódio (SDS) e N, N-dimetil formamida 50%. Após 30 min. de incubação, a densidade óptica foi determinada a 570 nm em leitor automático de ELISA (BIORARD 2550 READER EIA). Os resultados foram expressos como a porcentagem de células viáveis em relação ao controle.

### 3.2.5 Estímulo com neuwiedase

As células foram cultivadas a 37°C e CO<sub>2</sub> 5% em placas de 24 poços (1×10<sup>5</sup> células/poço) e estimuladas por 24 h com diferentes concentrações de neuwiedase (3, 6 e 12 µg/mL), em triplicata. Os sobrenadantes foram coletados e armazenados a -70 °C para posterior dosagem das citocinas.

### 3.2.6 Dosagem de citocinas e quimiocinas por Elisa (“Enzime Linked Immunosorbent Assay”)

Citocinas e quimiocinas (IL-10, IL-12p40, TNF-α e IL-8) presentes nos sobrenadantes de cultura foram dosadas com o uso de Kits de ELISA (BD Bioscience), de acordo com instruções do fabricante por meio da comparação com uma curva padrão construída com as respectivas citocinas e quimiocinas humanas recombinantes.

### 3.2.7 Análise estatística

Os gráficos e as análises estatísticas foram realizados utilizando o programa Statview for Windows versão 4.57 (Abacus Concepts, Inc., Copyright 1992-1996). O teste de Kruskal-Wallis foi utilizado para comparar os diferentes grupos e o teste de Mann-Whitney para comparar diferenças entre dois grupos (p<0,05).

### 3.3 Resultados

#### 3.3.1 Purificação da neuwiedase

Os gráficos relativos aos dois passos cromatográficos encontram-se na figuras 1 e 2. O gel de SDS-PAGE a 14% corado com prata mostra a presença de uma única banda, referente a neuwiedase. (Figura 3)

#### 3.3.2 Viabilidade celular

A neuwiedase, nas concentrações analisadas, não alterou significativamente a viabilidade das células mononucleares do sangue periférico humano, conforme observado na Figura 4.

#### 3.3.3 Efeitos da neuwiedase sobre a produção de citocinas e quimiocinas

O estímulo de PBMC com neuwiedase resultou em um aumento na liberação de TNF- $\alpha$ , IL-12p40 e IL-8 após 24 horas. Sob o estímulo com a maior dose de neuwiedase (12  $\mu$ g/mL) foi observado um aumento de cerca de 4 vezes em relação ao controle na produção de IL-12p40. A liberação de IL-8 sob estímulo da menor dose de neuwiedase (3  $\mu$ g/mL) foi aproximadamente o dobro em relação ao controle. Quanto à liberação de TNF- $\alpha$ , a menor dose da toxina estimulou a produção em cerca de 10 vezes mais em relação ao controle (Fig. 5A, 5B e 5C). A neuwiedase, em todas as doses testadas, não influenciou a produção de IL-10 pelas PBMC, confirmando o efeito inflamatório dessa toxina. (Figura 6)

### 3.4 Discussão

Apesar dos esforços conduzidos por alguns grupos de pesquisadores, informações a respeito dos mecanismos pelos quais as metaloproteases causam lesão tecidual em vítimas de envenenamento ofídico são ainda escassas (Rodrigues et al., 2004). Este trabalho teve como objetivo investigar os efeitos da neuwiedase, uma metaloprotease da classe P-I isolada da peçonha de *Bothrops pauloensis*, na produção de IL-10, IL-8, TNF- $\alpha$  e IL-12p40 por células mononucleares do sangue periférico humanas (PBMC).

Os resultados encontrados no presente trabalho indicam fortemente que a neuwiedase estimula a produção de citocinas pró-inflamatórias por PBMC humanas. Após um estímulo de 24 h com neuwiedase, as PBMC aumentaram a produção de TNF- $\alpha$ , IL-12p40 e IL-8 em relação aos respectivos controles não estimulados. Em contraste, a neuwiedase não estimulou a liberação de IL-10, que é uma citocina com efeitos antiinflamatórios, particularmente sobre monócitos e macrófagos (Abbas e Lichtman, 2003). Nossos resultados mostram o papel da neuwiedase na ativação de mecanismos pró-inflamatórios com liberação de citocinas e quimiocinas em humanos, e corroboram dados reportados por Rodrigues e colaboradores (2001) ao evidenciarem a presença de leucócitos no músculo esquelético de camundongos após a injeção intramuscular dessa metaloprotease. O influxo de leucócitos dentro do tecido é um indicador primordial de resposta inflamatória aguda. Esta reação local é regulada e mantida por alguns mediadores solúveis como as citocinas, quimiocinas, alguns metabólitos derivados das lipooxigenases e fatores provenientes do soro (Farsky et al., 2000; Fernandes et al., 2006).

Níveis aumentados de citocinas pró-inflamatórias foram detectados no soro de vítimas humanas ou em modelos experimentais após envenenamento botrópico (Lomonte et al., 1993; Barravieira et al., 1995; Petricevich et al., 2000) e, no presente trabalho, em culturas de PBMC humanos estimulados com toxina isolada de peçonha de *Bothrops pauloensis*. As citocinas possuem um papel crucial na regulação de processos inflamatórios se mostrando como agentes endógenos pró-inflamatórios durante um quadro de envenenamento (Barravieira et al., 1995; Petricevich et al., 2000).

O envenenamento botrópico é caracterizado por pronunciados efeitos no local da picada incluindo notável dano tecidual local, isto é, necrose do músculo esquelético, edema, hemorragia, dermonecrose e bolhas, assim como por alterações sistêmicas, como hemorragia, choque cardiovascular, falência aguda renal e coagulopatias (Warrel, 1996; Gutiérrez, 1995; Rosenfeld, 1971; Fernandes et al., 2006). As metaloproteases presentes nas peçonhas de serpentes contribuem para o desenvolvimento de muitos desses sintomas, como hemorragia, inflamação e necrose (Fox e Serrano, 2005). Moura-da-Silva e colaboradores (1996) mostraram que metaloproteases de peçonhas de serpente clivam o TNF- $\alpha$  em sua forma madura, o que é um importante mecanismo de necrose mediada por venenos (Gearing et al., 1996; Voronov, 1999).

Embora a neuwiedase não induza a hemorragia quando aplicada sob a pele, anticorpos anti-neuwiedase são aptos a neutralizar a atividade hemorrágica do veneno bruto de *B. neuwiedi*. Esses resultados indicam que epítomos do domínio metaloprotease da neuwiedase exibem reações cruzadas com epítomos de metaloproteases com alta atividade hemorrágica presentes nesse veneno, resultando na neutralização da atividade hemorrágica (Rodrigues et al., 2001).

Essa observação sugere que metaloproteases de baixa ou nenhuma atividade hemorrágica podem ser úteis na produção de anticorpos neutralizantes contra toxinas hemorrágicas potentes e isso pode ter aplicações na produção de antivenenos que podem ser usados como antígenos em imunizações animais (Rodrigues et al., 2001).

Estratégias terapêuticas para o envenenamento botrópico podem ser desenvolvidas com base na caracterização dos principais mediadores envolvidos na resposta inflamatória e na lesão tecidual desencadeados após o acidente. No presente trabalho foi possível demonstrar que a neuwiedase é capaz de promover a inflamação por estimular a produção de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias pelas PBMCs humanas. Considerando a ausência de domínios “desintegrin-like”, rico em cisteína e “lectin-like” na estrutura de metaloproteases pertencentes à classe P-I, a elucidação dos mecanismos moleculares pelos quais o domínio metaloprotease induz respostas pro-inflamatórias constitui uma nova área de investigação bastante promissora para o entendimento dos efeitos locais conseqüentes a acidentes ofídicos, bem como no tratamento adequado das vítimas.

### **3.5 Agradecimentos**

Os autores agradecem a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro.



### 3.6 Referências

Abbas, A. K., Lichtman, A. H., 2003. Cellular and Molecular Immunology. 5<sup>a</sup> ed. W. B. Saunders Philadelphia.

Baldo, C., Tanjoni, I., Léon, I. R., Batista, I. F. C., Della-Casa, M. S., Clissa, P. B., Weinlich, R., Lopes-Ferreira, M., Lebrun, I., Amarante-Mendes, G. P., Rodrigues, V. M., Perales, J., Valente, R. H., Moura-da-Silva, A. M., 2007. BnP1, a novel P-I metalloproteinase from *Bothrops neuwiedi* venom: Biological effects benchmarking relatively to jararhagin, a P-III SVMP. *Toxicon* (2007).

Barravieira, B., Lomonte, B., Tarkowisk, A., Hanson, L.A., Meira, D. A., 1995. Acute-phase reactions, including cytokines, in patients bitten by *Bothrops* and *Crotalus* snake in Brazil. *Journal Venoms Animals and Toxins* 1, 1-11.

Bevilacqua, M. P., Nelson, R. M., 1993. Selectins. *The Journal of clinical investigation* 91, 379-387.

Clissa, P. B., Laing, G. D., Theakston, D. G., Mota, I., Taylor, M. J., Moura-da-Silva, A. M., 2001. The effect of jararhagin, a metalloproteinase from *Bothrops jararaca* venom, on pro-inflammatory cytokines released by murine peritoneal adherent cells. *Toxicon* 39, 1567-1573.

Farsky, S. H. P., Gonçalves, L. R. C., Gutiérrez, J. M., Correa, A. P., Rucavado, A., Gasque, P., Tambourg, D. V., 2000. *Bothrops asper* snake venom and its metalloproteinase BaP-1 activate the complement. Role in leucocyte recruitment. *Med. Inflamm.* 9, 213-221.

Fernandes, C. M., Zamuner, S. R., Zuliani, J. P., Rucavado, A., Gutiérrez, J. M., Teixeira, C. F. P., 2006. Inflammatory effects of BaP1 a metalloproteinase isolated

from *Bothrops asper* snake venom: Leukocyte recruitment and release of cytokines. *Toxicon* 47, 549-559.

Fox, J. W., Serrano, S. M. T., 2005. Structural considerations of the snake venom metalloproteinases, key members of the M12 reprotolysin family of metalloproteinases. *Toxicon* 45, 969-985.

Gearing A.J.H., Beckett P., Christodoulou M., Churchill M., Clements J., Davidson A.H., Drummond A.H., Galloway W.A., Gilbert R., Gordon J.L., Leber T.M., Mangan M., Miller K., Nayee P., Owen K., Patel S., Thomas W., Wells G., Wood L.M., Woolley K., 1994. Processing of tumor necrosis factor alpha precursor by metalloproteinases. *Nature* 370, 555-557.

Gutiérrez, J. M., 1995. Clinical toxicology of snakebite in central America. In: Meier, J., White, J. (Eds.), *Handbook of Clinical Toxicology of Animals Venoms and Poisons*. CRC Press, Boca Raton FL, p. 667-668.

Gutiérrez, J. M., Rucavado, A., 2000. Snake venom metalloproteinases: Their role in the pathogenesis of local tissue damage. *Biochimie* 82, 841-850.

Laemmli, U. K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.

Lomonte, L., Wong, B. R., Hanson, L. A., 1993 Host response to *Bothrops asper* snake venom. Analysis of edema formation, inflammatory cells and cytokine release in a mouse model. *Inflammation* 17, 93-105.

Manicone, A. M., McGuire, J. J., 2008. Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 19, 34-41.

Mosmann, T., 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods* 65, 55–63.

Moura-da-Silva, A. M., Laing, G. D., Paine, M. J. I., Politi, V., Crampton, J. M., Theakston, R. D. G., 1996. Processing of pro-tumour necrosis factor  $\alpha$  by venom metalloproteinases: a hypothesis explaining local tissue damage following snake bite. *European Journal of Immunology* 26, 2000-2005.

Petricevich, V.L., Teixeira, C. F.T., Tambourgi, D, V., Gutiérrez, J. M., 2000. Increments in serum cytokines and nitric oxide levels in mice injected with *Bothrops asper* and *Bothrops jararaca* snake venoms. *Toxicon* 38, 1253-1266.

Rodrigues, F. G., Petreski, J. H., Kanashiro, M. M., Lemos, L., Dias-da-Silva, W., Kipnis, T. L., 2004. The complement system is involved in acute inflammation but not in the hemorrhage produced by a *Bothrops atrox* snake venom low molecular mass proteinase. *Toxicon* 40, 1149-1156.

Rodrigues, V. M., Soares, A. M., Andrião-Escarso, S. H., Franceschi, A. M., Rucavado, A., Gutiérrez, J. M.; Giglio, J. R., 2001. Pathological alterations induced by neuwiedase, a metalloproteinase isolated from *Bothrops neuwiedi* snake venom. *Biochimie* 83, 471-479.

Rodrigues, V. M., Soares, A. M., Guerra-Sá, R., Rodrigues, V., Fontes, M. R. M., Giglio, J. R., 2000. Structural and functional characterization of Neuwiedase, a nonhemorrhagic fibrin(ogen)olytic metalloprotease from *Bothrops neuwiedi* snake venom. *Archives of Biochemistry and Biophysic* 381, 213-224.

Rosenfeld, G., 1971. Symptomatology, pathology and treatment of snake bites in South America. In: Buckley, E. E. (Eds), *Venomous animals and their venoms*, Academic Press, New York, 345-384.

Ryan, G. B., Majno, G., 1977. Acute inflammation. *The American Journal of Pathology* 86, 185-274.

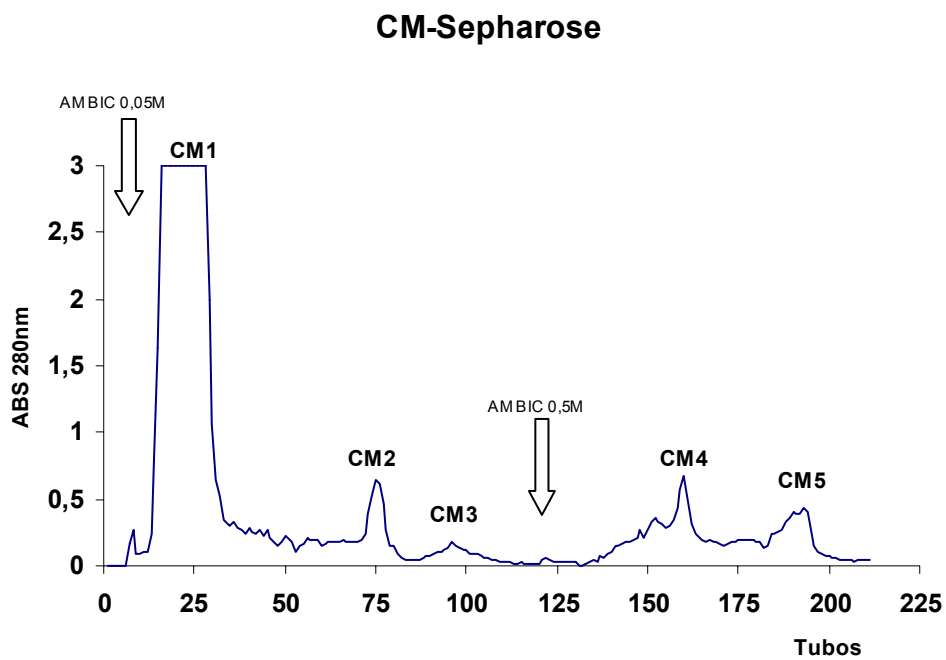
Voronov, E., Apte, R. N., Sofer, S., 1999. The systemic inflammatory response syndrome related to the release of cytokines following severe envenomation. *J. Venom Anim. Toxins* 5, 5-33.

Warrel, D.A., 1996. Clinical features of envenoming from snakebites. In: Bon, C., Goyffon, M. (Eds.), *Envenomings and Their Treatments*. Fondation Marcel Me´rieux, Lyon, p. 63–76.

## Figuras

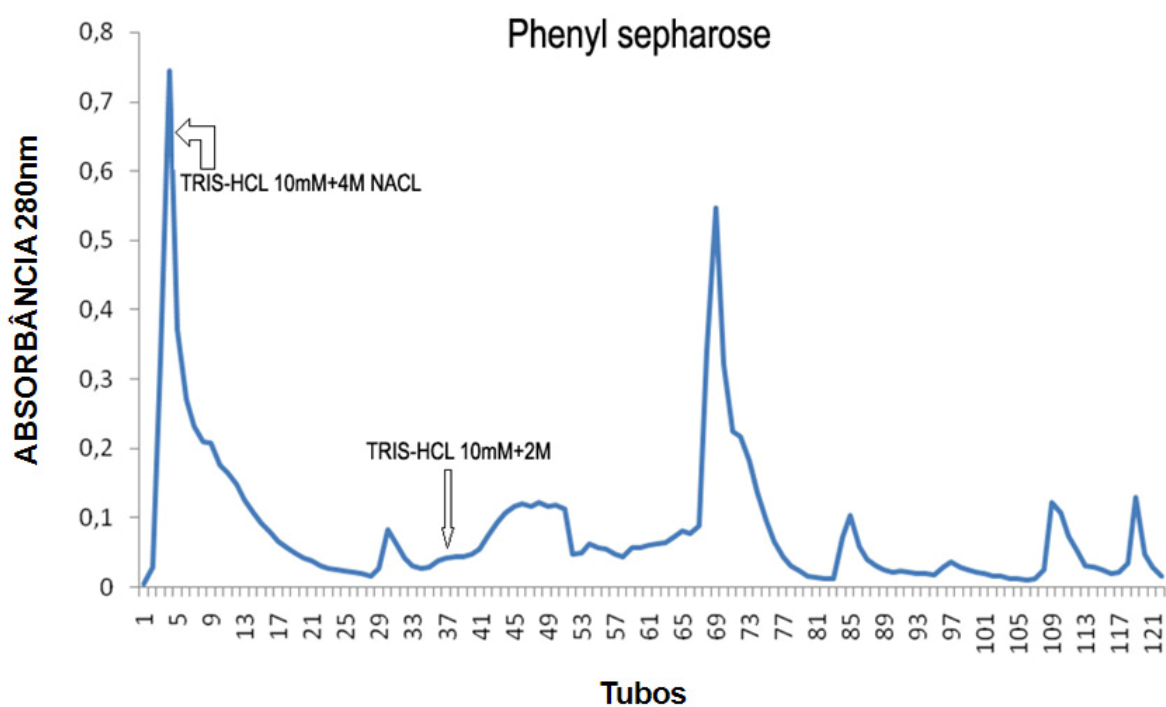
**Figura 1. Perfil cromatográfico de peçonha bruta de *Bothrops pauloensis* em resina de troca iônica CM-Sepharose.**

200mg da peçonha bruta (PB) de *Bothrops pauloensis* em coluna de CM-Sepharose equilibrada com tampão bicarbonato de amônio 0,05M, pH 7,8. As amostras foram eluídas em bicarbonato de amônia (0,05-0,5M), num fluxo de 20mL/h a temperatura ambiente. Frações de 3mL foram coletadas.

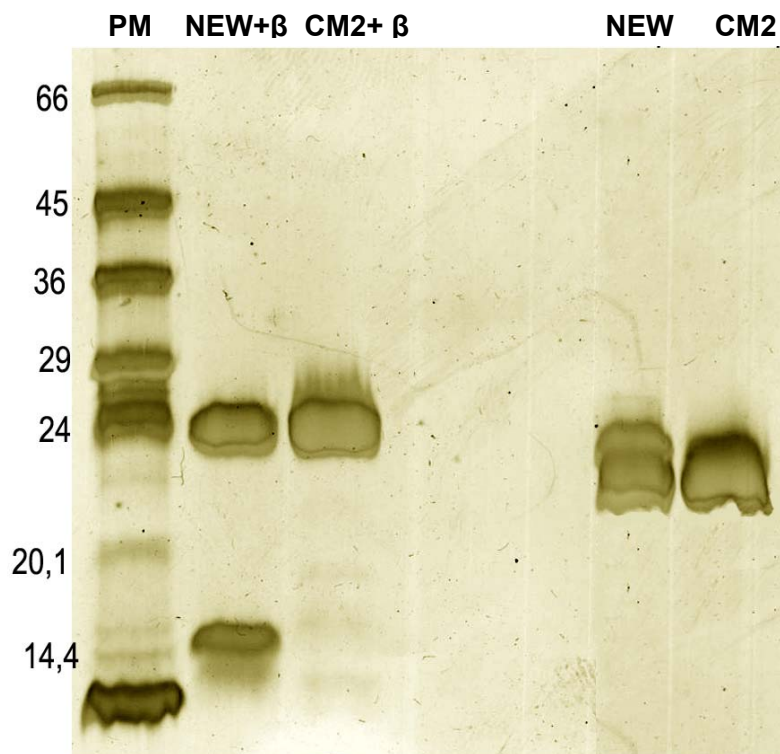


**Figura 2. Perfil cromatográfico da fração CM2 em resina de interação hidrofóbica Phenyl-Sepharose CL-4B.**

Recromatografia da fração CM2 em Phenyl-Sepharose CL-4B (2.0x20.0cm) previamente equilibrada com Tris-HCl 10mM pH 8,5 + NaCl 4M. A eluição foi realizada com Tris-HCl 10mM em concentrações molares. A neuwiedase foi eluída no primeiro pico Tris-HCl 10mM+ 4M NaCl.

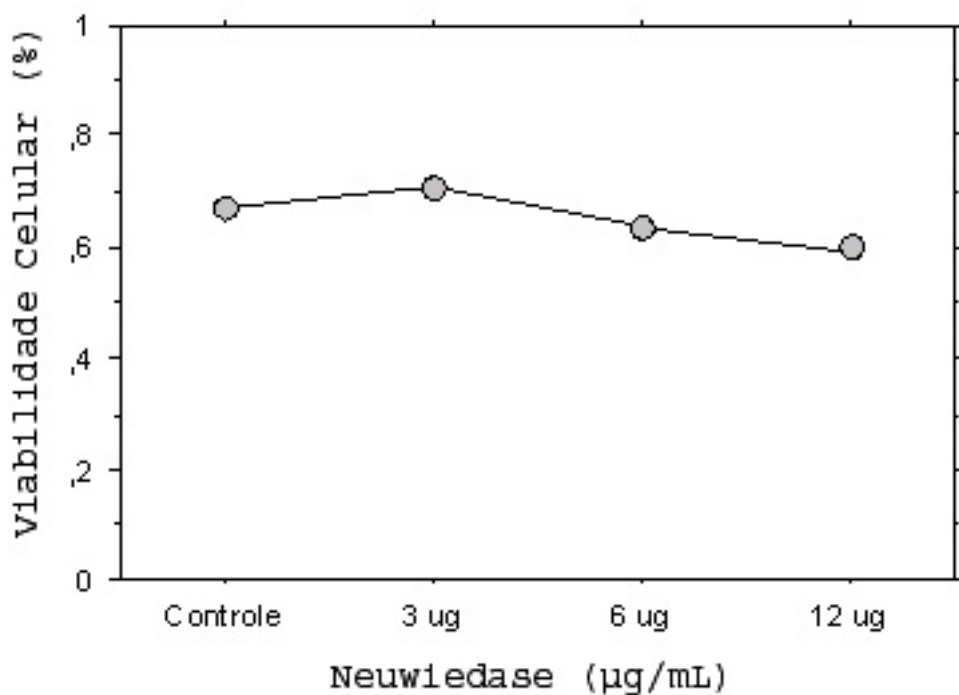


**Figura 3. Gel de SDS-PAGE 14 % corado com prata, evidenciando a pureza da neuwiedase pela presença de banda única.**



**Figura 4: Viabilidade celular das PBMC sob estímulo de neuwiedase *in vitro* determinada por ensaios de MTT**

Células mononucleares do sangue periférico humano (PBMC) foram cultivadas em placas de cultura de 96 poços na ausência (controle) ou presença de diferentes concentrações de neuwiedase (3,6 e 12  $\mu\text{g/mL}$ ) por 24 h. Os resultados foram expressos como a porcentagem de células viáveis em relação ao controle.

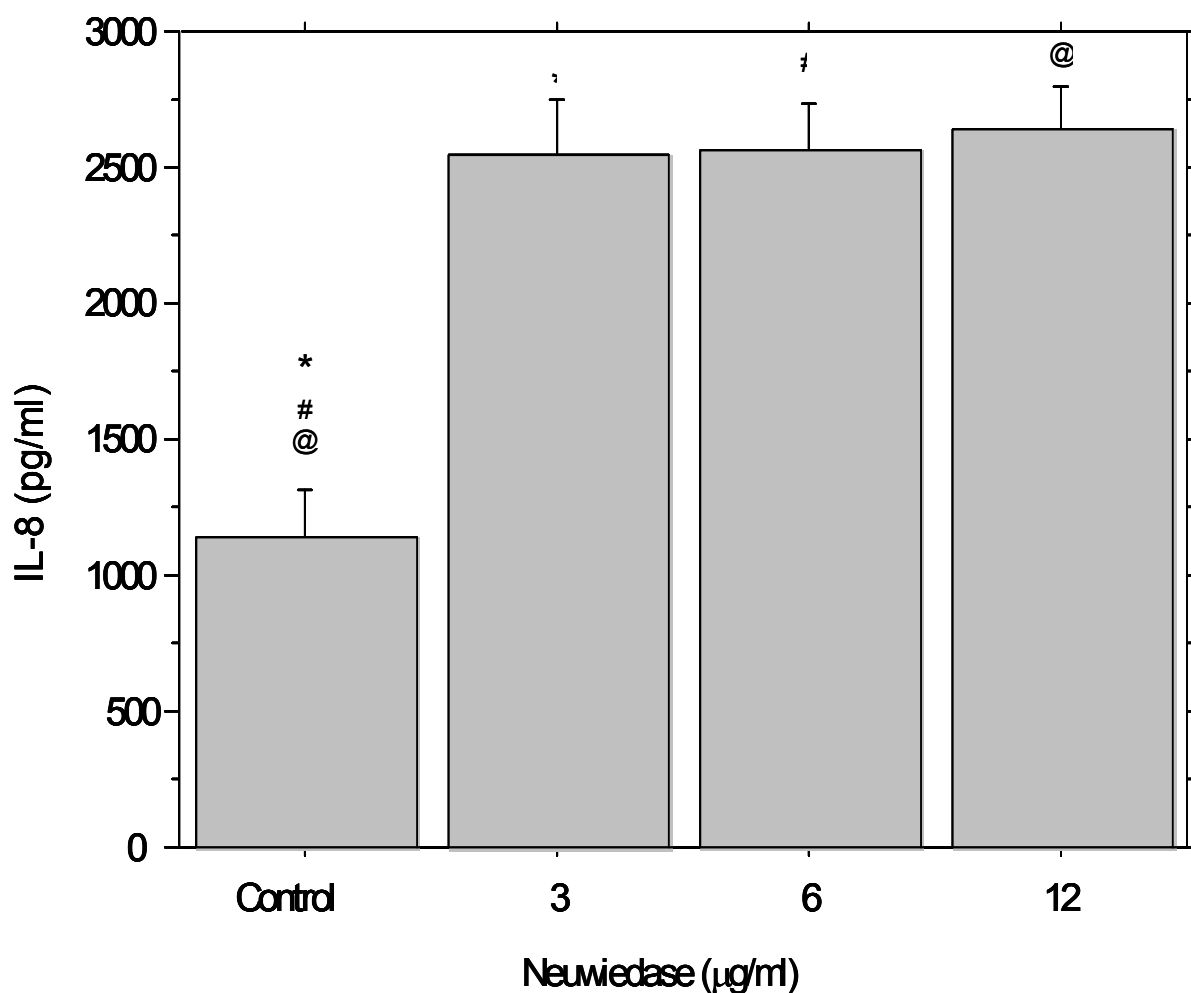


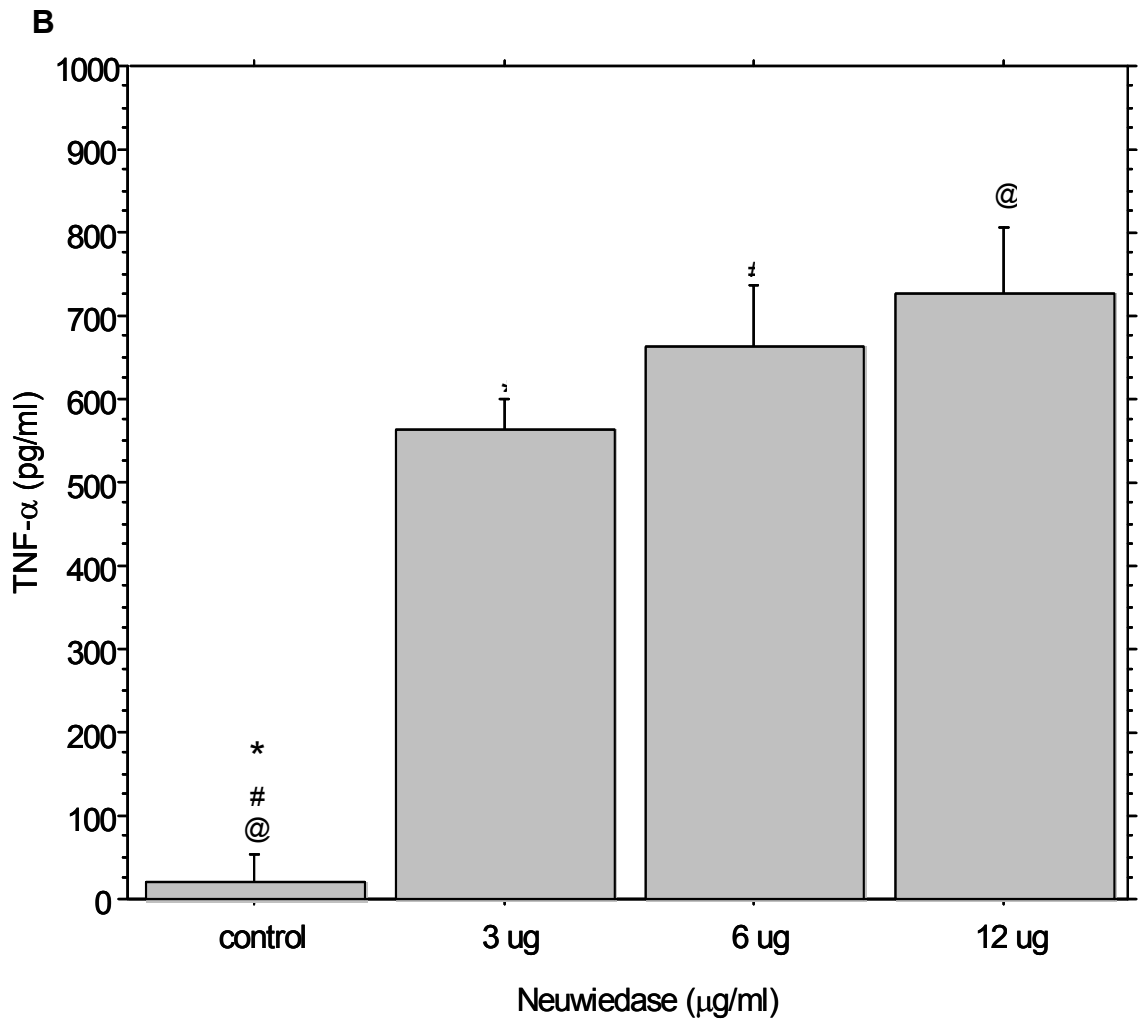


**Figura 5. Produção de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias por células mononucleares do sangue periférico (PBMC) sob estímulo de neuwiedase**

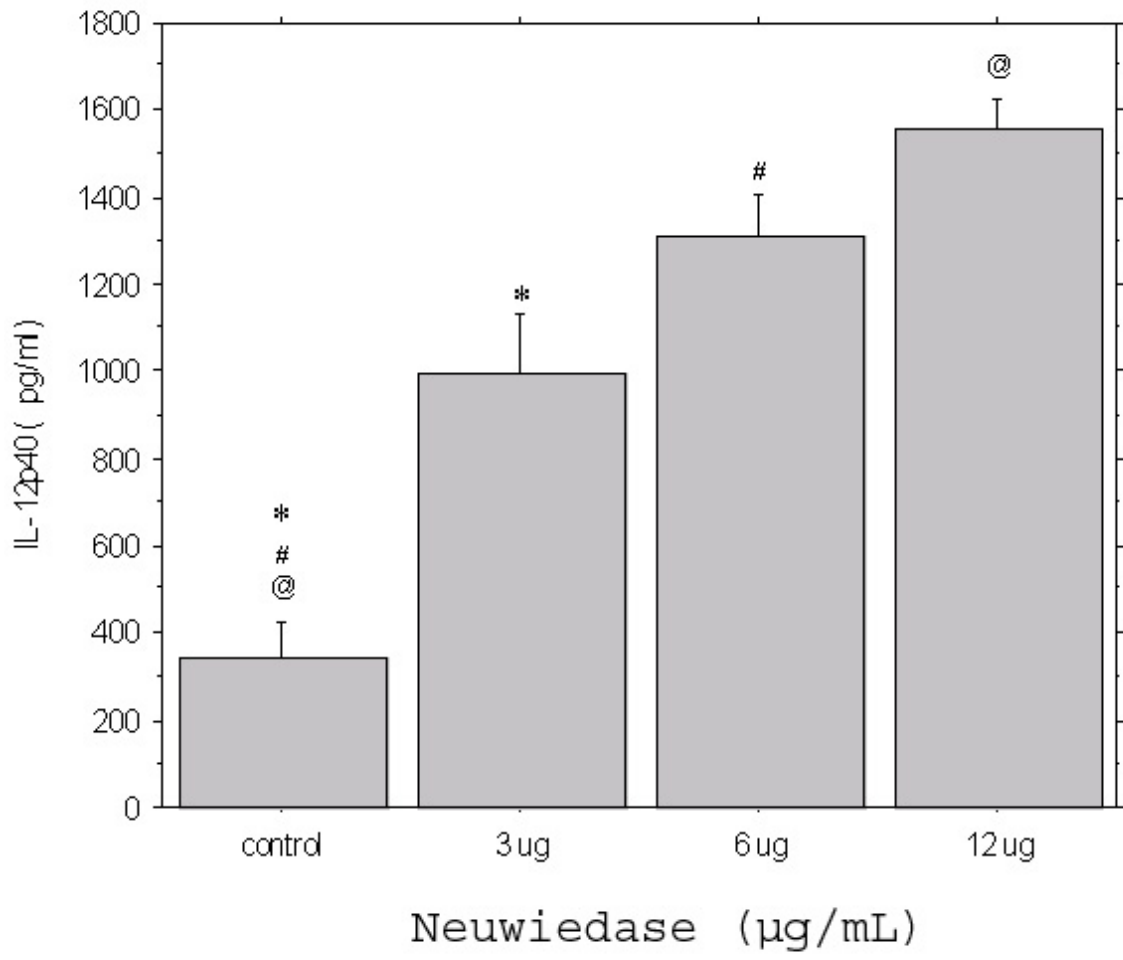
Os sobrenadantes da cultura de PBMC estimuladas com diferentes concentrações de neuwiedase foram coletados e utilizados em ensaios para detecção da quimiocina IL-8 (2A) e das citocinas TNF- $\alpha$  (2B) e IL-12p40 (2C). Os resultados foram expressos em pg/mL. A presença de símbolos iguais representa diferenças estatisticamente significativas entre si ( $p < 0,05$ ).

**A**





**c**



**Figura 6. Produção de citocina antiinflamatória IL-10 por células mononucleares do sangue periférico (PBMC) sob estímulo de neuwiedase**

Os sobrenadantes da cultura de PBMC estimuladas com diferentes concentrações de neuwiedase, coletados e utilizados em ensaios de ELISA para detecção da citocina IL-10. Os resultados foram expressos em pg/mL. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre si e nem em relação ao controle ( $p < 0,05$ ).

