



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

**Efeito antiparasitário sobre *Toxoplasma gondii* induzido pela BnSP-7,
uma PLA₂-Lys49 homóloga da peçonha de *Bothrops pauloensis***

Aluno: Isabela Pacheco Borges

Orientador: Veridiana de Melo Rodrigues Ávila

Co-Orientador: Bellisa de Freitas Barbosa

**UBERLÂNDIA - MG
2015**



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

**Efeito antiparasitário sobre *Toxoplasma gondii* induzido pela BnSP-7,
uma PLA₂-Lys49 homóloga da peçonha de *Bothrops pauloensis***

Aluno: Isabela Pacheco Borges

Orientador: Veridiana de Melo Rodrigues Ávila

Co-Orientador: Bellisa de Freitas Barbosa

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

**UBERLÂNDIA - MG
2015**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

- B732e
2016
- Borges, Isabela Pacheco, 1990
Efeito antiparasitário sobre *Toxoplasma gondii* induzido pela BNSP-7, uma PLA2-LYS49 homóloga da peçonha de *Bothrops pauloensis* / Isabela Pacheco Borges. - 2016.
69 p. : il.
- Orientadora: Veridiana de Melo Rodrigues Ávila.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica.
Inclui bibliografia.
1. Bioquímica - Teses. 2. *Toxoplasma gondii* - Teses. 3. *Bothrops* - Teses. 4. Fosfolipases - Teses. I. Ávila, Veridiana de Melo Rodrigues. II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica. III. Título.

CDU: 577.1



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

**Efeito antiparasitário sobre *Toxoplasma gondii* induzido pela BnSP-7,
uma PLA₂-Lys49 homóloga da peçonha de *Bothrops pauloensis***

ALUNO: Isabela Pacheco Borges

COMISSÃO EXAMINADORA

Presidente: Professora Dra. Veridiana de Melo Rodrigues Ávila

Examinadores:

Professor Dr. Marcos Roberto de Mattos Fontes

Professora Dra. Angélica de Oliveira Gomes

Data da Defesa: 30 /07 /2015

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

Profa. Dra. Veridiana de Melo Rodrigues Ávila

Dedicatória

Dedico esse trabalho a pessoas de inestimável importância em minha vida:

A meus pais, Marcos e Maria Inês e ao meu irmão Rafael, pelo amor incondicional e principalmente por sempre me apoiarem em qualquer momento e qualquer circunstância. O amor de vocês me dá força para sempre seguir em frente e me tornar uma profissional melhor.

A minha avó Cleide por toda sua dedicação a família, por orar sempre pelo meu sucesso e ter tanta fé no meu potencial! Madrinha, eu te amo muito!

À Letícia, com quem eu tenho o privilégio de trabalhar desde o primeiro dia que entrei no laboratório. Minha querida, eu não tenho palavras para agradecer o que você representou nessa dissertação. Obrigada pelo seu espírito de grupo, por sempre fazer de tudo para ajudar as pessoas que estão a sua volta! Obrigada pela generosa forma como você contribuiu em todo esse trabalho!

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê.” (Arthur Schopenhauer)

Agradecimentos

A Deus, por sempre olhar e cuidar de mim, por ouvir minhas preces. Só Ele sabe o melhor caminho para todos nós!!

À prof.^a Dr^a Veridiana de Melo Rodrigues Ávila pela orientação desde a iniciação científica, por sempre ter acreditado que eu era capaz! Veri, muito obrigada por toda a sua dedicação, não só a mim, mas a todos os colegas de laboratório! Obrigada por ser presente, pelo apoio, incentivo, pela paciência com minhas dúvidas e erros e por ser esse grande exemplo de pessoa e profissional. Meu eterno carinho e gratidão por toda trajetória que trilhamos até agora!

À prof.^a Dr^a Eloísa Amália Vieira Ferro pelo carinho e pela oportunidade de trabalhar em seu laboratório! Obrigada por estar sempre disponível em nos ajudar a encontrar o melhor caminho.

À prof.^a Dr^a Bellisa por ser tão disposta a ajudar nos experimentos, desde o desenho experimental até a execução dos mesmos. Obrigada pelas considerações preciosas para a execução do projeto e escrita dos artigos e da dissertação.

À família Pacheco e Borges, pelo apoio, amor. Família é a base para o caráter e sucesso de qualquer pessoa. É um privilégio ter vocês ao meu lado.

As minhas queridas primas Geordana, Ludmila, Priscila, pelas risadas, confidências, planejamento de viagens e pelos nossos deliciosos encontros das primasonline!

Aos meus grandes amigos Carol, Priscila, Walter, Carolina Nativa, sem o apoio e compreensão de vocês eu não teria conseguido. Muito obrigada por conhecerem tão bem as minhas necessidades, pela paciência nos momentos difíceis, por me acolherem sem pedir nada em troca. Vocês me mostram que a amizade é essencial para dar forças para seguir em frente. Eu amo vocês!!

Aos meus amigos de laboratório Marina, Débora, Dayane, Mônica, Maxwell, Letícia por fazerem do laboratório um ambiente descontraído e mais prazeroso, por todas as conversas, desabafos, pelos conselhos e principalmente pelo privilégio de ter construído um laço especial nesses anos de convivência.

Aos demais amigos de laboratório: Paulo, Stefani, Luana, Vitor, Márcia, Denise, David, pela boa convivência e conversas descontraídas no ambiente de trabalho.

Aos meus amigos Túlio e Isis pela grande amizade construída. Mesmo tendo rotinas e horários bem diferentes, vocês sempre estiveram ao meu lado, se fazendo presentes e interessados em participar da minha vida! Obrigada por terem me acompanhado durante esses anos. Espero que sempre seja assim!

Às alunas do Laboratório de Imunofisiologia da Reprodução, em especial a Rafaela. Rafinha, muito obrigada por toda ajuda durante o mestrado, seja durante os experimentos, me auxiliando no entendimento das metodologias, escutando meus desabafos e por me fazer rir com a sua endoscopia hahaha! Foi muito prazeroso trabalhar com você e fortificar ainda mais a nossa amizade!

Às funcionárias do Laboratório: Tianinha e Marina por toda ajuda com as atividades e o bom funcionamento do laboratório.

Ao apoio financeiro do CAPES, UFU e FAMPEMIG.

Sumário

Dedicatória	iv
Agradecimentos	vi
Apresentação	1
Capítulo 1:	2
Fundamentação teórica.....	2
1.1 - <i>Toxoplasma gondii</i>	3
1.2 - Ciclo de vida	5
1.3 - Resposta Imune.....	8
1.4 - Toxoplasmose.....	10
1.5 – Peçonhas ofídicas	13
1.6 - Fosfolipase A ₂ : Tipos, estrutura e mecanismos de ação.....	15
1.7 – Ação anti-Toxoplasma de toxinas de <i>Bothrops pauloensis</i> :	20
Referências Bibliográficas	21
Capítulo 2:	37
Resumo	38
Abstract	40
2.0 - Introduction	41
3.0 - Material and methods.....	42
3.1- BnSP-7 purification	42
3.2 - Cell culture	43
3.3 – Parasites	43
3.4 - Cellular viability in HeLa cells	43
3.5 - Tachyzoite viability.....	44
3.6 - Adhesion Assay	44
3.7 - Intracellular Proliferation Assay	45
3.8 - Cytokine measurement	46
3.9 - Statistical analysis.....	46
4.0 - Results	46
4.1 - BnSP-7 alters the viability in HeLa cells, but not in <i>T. gondii</i> tachyzoites	46
4.2 - <i>T. gondii</i> tachyzoites previously treated with BnSP-7 reduce their adhesion in HeLa cells	47

4.3 - <i>T. gondii</i> tachyzoites previously treated with BnSP-7 reduce their intracellular proliferation in HeLa cells	47
4.4 - BnSP-7 increases the IL-6 and MIF release	48
5.0 – Discussion	48
Acknowledgements:	52
Financial Support:	52
References:	53
Figures:	63

Apresentação

Toxoplasma gondii é um parasita intracelular obrigatório capaz de infectar e se replicar em qualquer célula nucleada de mamíferos e aves. É o agente etiológico da doença toxoplasmose, infectando cronicamente aproximadamente um terço da população mundial. É uma das infecções parasitárias mais comuns ao homem e a outros animais homeotérmicos. Na maioria dos adultos a toxoplasmose é assintomática, porém em alguns indivíduos imunocomprometidos causa grande morbidade e mortalidade.

As fosfolipases A_2 catalisam a hidrólise de fosfolipídeos, liberando como produtos ácidos graxos livres e lisofosfolipídeos. As fosfolipases das peçonhas de serpentes são amplamente estudadas devido à variedade de seus efeitos farmacológicos como neurotoxicidade, miotoxicidade, cardiotoxicidade, ativação ou inibição da agregação plaquetária, anticoagulação, edema, convulsão, hipotensão, dentre outras. Fosfolipases A_2 de peçonha de serpente vem demonstrando um potencial terapêutico e antiparasitário em vários parasitas, e por isso o presente trabalho buscou investigar os efeitos de uma fosfolipase A_2 isolada da peçonha de *Bothrops pauloensis* em *Toxoplasma gondii*.

Essa dissertação foi elaborada de acordo com as normas da Pós graduação em Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia, sendo o capítulo 1 constituído de uma fundamentação teórica, ou seja, um breve levantamento bibliográfico sobre o assunto estudado. O capítulo 2 foi escrito em formato de artigo a ser enviado a uma revista internacional indexada, abordando, sobretudo os métodos utilizados, os resultados e sua discussão. O trabalho descreve a ação de uma fosfolipase Lys49 denominada BnSP-7 purificada da peçonha de *Bothrops pauloensis* sobre *Toxoplasma gondii*.

Capítulo 1:

Fundamentação teórica

1.1 - *Toxoplasma gondii*

Toxoplasma gondii é um protozoário parasito intracelular obrigatório, importante patógeno oportunista em diversos hospedeiros. É capaz infectar aves, mamíferos e humanos, e ainda tem a capacidade de se multiplicar na maioria das células desses hospedeiros (DUBEY, 1993; LAVINE e ARRIZABALAGA, 2009). Isto justifica sua ampla distribuição e elevada soroprevalência. Sendo um dos mais abundantes parasitos eucariontes em humanos (TENTER *et al.*; 2000).

Toxoplasma foi descoberto por Splendore em 1908, em um coelho de laboratório em São Paulo, Brasil, e na mesma época por Nicolle e Manceaux em um roedor africano, o *Ctenodactylus gondii* (NEVES, 2004). A designação do parasita é devido a sua forma arqueada, originada do grego onde *toxon* significa arco (BLACK e BOOTHROYD, 2000) e também do nome desse roedor (*Ctenodactylus gondii*) onde o parasita foi isolado.

T. gondii faz parte do filo Apicomplexa, classe Sporozoa, subclasse Coccidia, ordem Eucoccidia e família Sarcocystidae (REY, 2001). O filo Apicomplexa é um dos mais importantes grupos de parasitas protistas responsáveis por doenças humanas e animais (BESTEIRO, 2012). Neste filo, estão incluídos diversos patógenos de importância médica e veterinária, como *Plasmodium* spp (agente causador da malária), *Cryptosporidium* spp (causador de diarreias graves em imunocomprometidos), *Eimeria* spp (causador da coccidiose em aves) e *Besnoitia* sp, *Babesia bovis* e *Theileria* spp (parasitos de gado) (SOUZA *et al.*; 2010). Por isso o estudo e a busca por novas estratégias para combater esses parasitas estão constantemente sendo exigidas (BESTEIRO, 2012).

Os parasitos pertencentes ao filo Apicomplexa apresentam características comuns, como a presença de um complexo apical composto por organelas, tais como roptrias, micronemas e conoide. Os micronemas e roptrias são organelas secretoras responsáveis pela mobilidade do parasito, adesão e invasão da célula hospedeira (CARRUTHERS, 1999; MORRISSETTE e SIBLEY, 2002). (Figura 1)

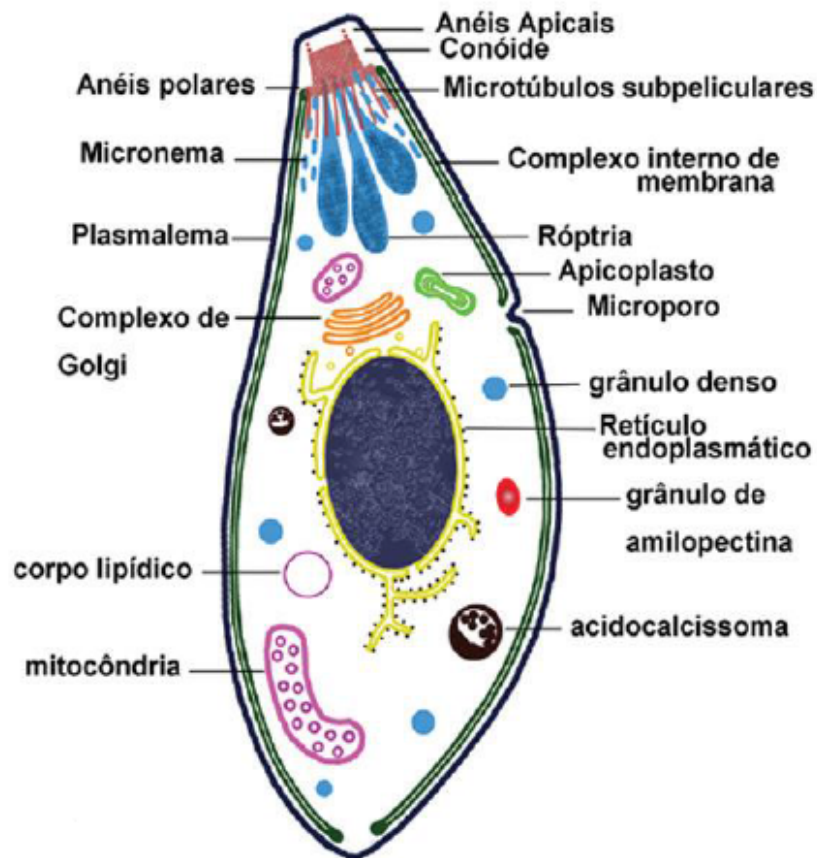


Figura 1: Morfologia geral da forma taquizoíta de *Toxoplasma gondii*. Representação esquemática. Fonte: (Souza *et al.*, 2010)

T. gondii possui três formas evolutivas conhecidas: taquizoítas, bradizoítas e esporozoítas (KAWAZOE, 2005). Os taquizoítas representam a forma de multiplicação rápida do parasito na célula hospedeira (MONTROYA; LIESENFELD, 2004). Apresentam forma em “arco” ou “meia lua” que, por vezes torna-se arredondada. Medem de 4 a 7 por 2 a 4 μm de diâmetro, sendo sua extremidade anterior mais afilada do que a posterior (SILVA *et al.*, 2006). Seu núcleo, na maioria das vezes, é semicentral, localizado na metade posterior. São vulneráveis aos fatores de defesa do hospedeiro e, por isso, são estudados como alvos preferenciais para a escolha, ação e desenvolvimento de medicamentos (KIM e WEISS, 2004; RADKE *et al.*, 2006). São vistos na fase aguda da infecção distribuída pelo sistema circulatório e tem a capacidade de infectar vários tecidos (REMINGTON *et al.*, 2001; NISHIKAWA *et al.*, 2008, TENTER, 2009).

Os bradizoítos são organismos de proliferação lenta ou de repouso nos cistos do *Toxoplasma* (devido à pressão imposta pela resposta imune) e se

desenvolvem durante a infecção crônica (NEVES, 2004). Tais cistos podem ter tamanho variável; os jovens podem medir 5 µm, possuindo 4 bradizoítas; os cistos mais velhos podem ter até 100 µm e conter centenas de bradizoítas em seu interior (DUBEY *et al.*, 1998). Podem estar presentes em qualquer tecido do hospedeiro, porém são mais frequentes nos músculos esquelético e cardíaco, tecido nervoso e região ocular (MONTROYA e LIESENFELD, 2004; NISHIKAWA *et al.*, 2008; SKARIAH *et al.*, 2010). Intacto, o cisto pode persistir no hospedeiro sem causar nenhum dano, representando reservatório da infecção. A ruptura de elevado número de cistos provoca a liberação dos bradizoítas e que posteriormente ocorrerá a diferenciação para taquizoita que proliferarão na vigência de imunossupressão (REMYINGTON *et al.*, 2001; ELSHEIKHA, 2008).

Já os esporozoítas estão presentes dentro dos oocistos liberados nas fezes de felídeos e correspondem as formas infectantes oriundas do processo de reprodução sexuada do parasito encontrada no ambiente podendo contaminar água, solos e alimentos (AMENDOEIRA, 1995; MONTROYA; LIESENFELD, 2004).

1.2 - Ciclo de vida

Toxoplasma gondii é um protozoário é considerado um dos patógenos mais bem sucedidos do mundo (BLADER e KOSHY, 2014). Vários fatores contribuem para esse sucesso, incluindo um complexo ciclo de vida em que o parasita pode se propagar de maneira eficiente e rápida dentro de hospedeiros definitivos e hospedeiros intermediários e ser disseminado por meios verticais e horizontais (KIM e WEISS, 2004). Possui um ciclo de vida facultativamente heteroxeno e infecta, todas as espécies de animais homeotérmicos como aves e mamíferos, inclusive o homem (SILVA *et al.*, 2003). Os gatos domésticos e outros felídeos são os únicos hospedeiros definitivos, mas muitas espécies de vertebrados servem como hospedeiros intermediários (MARTINS e VIANA, 1998; HILL *et al.*, 2005).

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). Ao ingerirem cistos teciduais, oocistos maduros ou taquizoítas, os hospedeiros definitivos de *T. gondii*

pertencentes aos gêneros *Felix* e *Lynx*, se contaminam, dando início assim ao ciclo sexuado no epitélio intestinal desses animais (REY, 2001; KAWAZOE, 2005). Após a ingestão de cistos teciduais pelos felídeos, a parede do cisto é rompida por enzimas proteolíticas gástricas e bradizoítas são liberados, penetrando nas mucosas do estômago e/ou intestino delgado.

Estes bradizoítas multiplicam-se assexuadamente dando origem a merozoítos no interior do vacúolo parasitóforo. Os merozoítos, então, darão origem aos gametas masculinos e femininos. O gameta feminino é fecundado pelo masculino e após a fertilização, a formação da parede do oocisto é iniciada em volta do gameta fertilizado, ocorrendo à liberação dos mesmos no lúmen intestinal através da ruptura das células epiteliais intestinais e eliminação nas fezes dos felídeos. Durante a infecção aguda alguns milhões de oocistos são eliminados nas fezes dos gatos por 7 a 21 dias (MONTROYA e LIESENFELD, 2004).

Uma vez eliminado, os oocistos levam de 1 a 5 dias para amadurecerem tornando-se altamente infectante através da esporulação e sobrevivem no ambiente por meses e possivelmente anos. Os oocistos esporulados possuem dois esporocistos com quatro esporozoítas cada (DUBEY *et al.*, 1998; BLACK e BOOTHROYD, 2000.; JEFFREY *et al.*, 2005; MOURA *et al.*, 2009). A ingestão de oocistos maduros presentes no solo, água e alimentos; ingestão de cistos teciduais em carnes cruas ou mal cozidas, por qualquer animal homeotérmico, se tornará um hospedeiro intermediário para o ciclo assexuado do parasita. (MONTROYA e LIESENFELD, 2004; JEFFREY *et al.*, 2005; DUMETRE *et al.*, 2008).

Os esporozoítos que são liberados a partir dos oocistos irão infectar o epitélio intestinal e diferenciar-se no estágio de taquizoíto. O estágio de taquizoíto define a forma de crescimento rápido do parasita encontrada durante a fase aguda da toxoplasmose (BLACK e BOOTHROYDE, 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.

Os taquizoítos são transformados em bradizoítos mediante as pressões da resposta imune para formar cistos. Os bradizoítos persistem dentro dos cistos durante a vida do hospedeiro. Eles são morfologicamente idênticos aos taquizoítos, mas multiplicam-se lentamente. Os cistos contêm centenas de milhares de bradizoítos e se formam dentro de células cerebrais, músculos cardíaco e esquelético dos hospedeiros, o que caracteriza a fase crônica da toxoplasmose (MONTROYA e LIESENFELD, 2004).

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) (Figura 2).

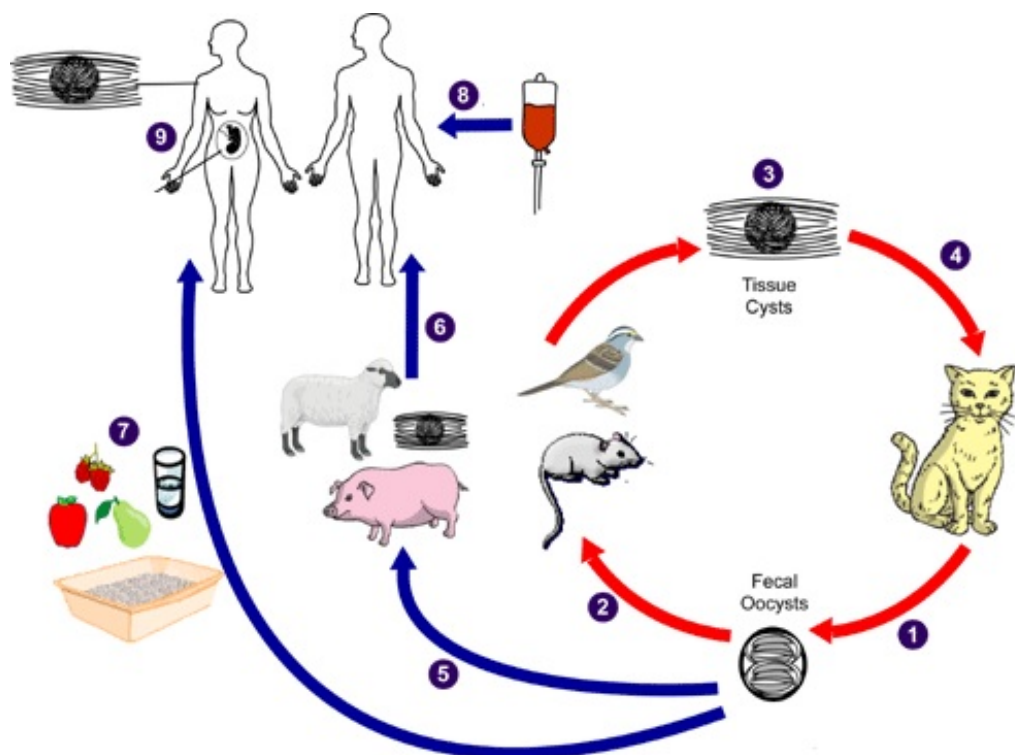


Figura 2: Representação esquemática do ciclo de infectividade do parasita toxoplasma gondii. 1- Oocistos esporulados são eliminados nas fezes do gato; 2 - Hospedeiros intermediários na natureza (incluindo aves e roedores) podem ser infectados após

ingerir água ou material vegetal contaminado com oocistos; 3- Oocistos transformam em taquizoítos logo após a ingestão. Estes taquizoítos localizam em tecido neural e muscular e se desenvolvem em tecidos bradizoítos; 4- Gatos são infectados após o consumo de hospedeiros intermediários que abrigam cistos teciduais; 5 - Animais criados para consumo humano e de caça selvagem também podem ser infectados com cistos teciduais após a ingestão de oocistos esporulados no ambiente; 6- Os seres humanos podem ser infectados ao comerem carne mal cozida de animais que abrigam cistos teciduais; 7 – Humanos podem consumir alimentos ou água contaminada com fezes de gato ou por amostras ambientais contaminadas; 8 - Transfusão de sangue e transplante de órgãos; 9 – Transmissão transplacentária; fonte: <http://www.cdc.gov/parasites/toxoplasmosis/biology.html> (adaptado).

1.3 - Resposta Imune

Para analisarmos o sucesso de qualquer parasita deve-se, além de qualificar os distúrbios que ele causa a um hospedeiro, mas a sua capacidade de adaptação e integração ao ambiente do hospedeiro. *Toxoplasma*, assim como outros parasitas pertencentes ao filo Apicomplexa como: *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 se 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).

Os vertebrados desenvolveram ao longo dos milhares de anos de evolução muitas defesas diferentes contra os patógenos, e assim como os vertebrados a maioria dos protozoários também evoluiu mecanismos para escapar das consequências das respostas do sistema imune de seus hospedeiros (PINON *et al.*, 2001; TIZARD *et al.*, 2002). Delicadas adaptações do parasito com o hospedeiro asseguram a sobrevivência do parasito sem induzir doença no hospedeiro (TENTER *et al.*, 2000; LANG *et al.*, 2007). *T. gondii* por ser um parasita intracelular obrigatório depende desse balanço da sua interação com seus hospedeiros intermediários, tornando possível uma interação de longa duração para a sua sobrevivência.

A imunidade celular é considerada um componente chave na resposta imune do hospedeiro, uma vez que é responsável pelo controle da replicação de *T. gondii* (SCHLUTER *et al.*, 1991). O controle da infecção é o resultado de mecanismos complexos que envolvem elementos da resposta imune inata e adaptativa. A resposta imune inicial ou inata envolve a participação de macrófagos, células dendríticas e células *Natural Killer* (NK), além de outras células de natureza não hematopoiética (HAUSER *et al.*, 1983). Essas células constituem a primeira linha de defesa contra o parasito durante a fase inicial da infecção (SHER *et al.*, 1993; GAZZINELLI *et al.*, 1993). A citocina IL-12, produzida por macrófagos, neutrófilos e especialmente por células dendríticas - é crucial para indução de uma resposta imunológica contra *T. gondii*, que resulta na diferenciação e expansão clonal de células de perfil Th1.

Células Th1 secretam IFN- γ , TNF- α e TNF- β e IL-2 que ativam reações mediadas por células. Células Th2 secretam IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13, que favorecem a produção de anticorpos (CHERWINSKI *et al.*, 1987). Células NK também secretam IFN- γ e parecem agir em sinergismo com os macrófagos na imunidade inata (HUNTER *et al.*, 1994).

A ativação de macrófagos por IFN- γ induz suas atividades microbidas que incluem mecanismos oxidativos e não oxidativos (PFEFFERKON *et al.*, 1986; DING *et al.*, 1988; HUGHES, 1988; LANG *et al.*, 2007; HESELER *et al.*, 2008). IFN- γ é a principal citocina envolvida no controle da infecção por *T. gondii* (SUZUKI *et al.*, 1988), e além da ativação dos mecanismos microbidas de macrófagos como já descrito, possui muitas outras atividades biológicas, dentre elas a promoção da citotoxicidade de linfócitos TCD8+ (MCCABE *et al.*, 1984), a conversão de taquizoítas em bradizoítas e, ao mesmo tempo, a prevenção da ruptura dos cistos teciduais, impedindo a reativação do parasito no hospedeiro (BOHNE *et al.*, 1993; SKARIAH *et al.*, 2010).

Isto leva a ativação células efectoras a controlar a replicação intracelular do parasito, ou eventualmente causa destruição de *T. gondii* (YAP e SHER, 1999). Portanto, IFN- γ e outras citocinas, tais como TNF- α , IL-6 e IL-1 agem em sinergismo na indução de uma resposta imunológica adequada contra *T. gondii* (SIBLEY *et al.*, 1991).

Um balanço preciso na produção entre citocinas pró e anti-inflamatórias, entre as quais podemos destacar: IL-12 e IL-10 respectivamente são essenciais para o controle da infecção por *Toxoplasma* (ALDEBERT *et al.*, 2007). Durante a fase aguda da infecção, a interleucina 12 (IL-12), a qual é secretada por macrófagos, parece desempenhar o principal papel anti-*Toxoplasma*. A IL-12 é também essencial na fase crônica da infecção, quando é responsável pela manutenção da resposta imune em longo prazo (FILISSETTI e CANDOLFI, 2004).

De um modo geral, a resposta imune do hospedeiro contra *T. gondii* é tipicamente celular e pró-inflamatória, caracterizada pela alta produção de citocinas inflamatórias que ativam células fundamentais no controle da infecção. Os anticorpos desempenham um papel secundário no controle da infecção por *T. gondii*, no entanto são importantes no estabelecimento de diagnóstico sorológico para a doença (GROSS *et al.*, 2004; PETERSEN, 2007).

Apesar dessas elaboradas estratégias executadas pelo sistema imune, *T. gondii* apresenta inúmeros mecanismos capazes de regular a resposta imune do hospedeiro, no intuito de escapar da resposta e manter-se viável nas células hospedeiras (DENKERS, 2003). *T. gondii* é capaz de modular a resposta imunológica por estimular citocinas pró e anti-inflamatórias. A secreção de IL-10 induzida por ele, por exemplo, pode desativar macrófagos e, conseqüentemente, diminuir a atividade microbida pela diminuição da produção de IFN- γ , facilitando assim, a sobrevivência intracelular do parasito (BOGDAN e NATHAN, 1993).

Outra via de modulação por *T. gondii* envolve o controle da apoptose das células hospedeiras. A apoptose é crucial por regular a resposta imunológica (KRAMMER, 2000). Por ser ele um parasito intracelular obrigatório, não é interessante que a célula hospedeira sofra danos a ponto de provocar uma morte celular, o que impossibilitaria o desenvolvimento do parasita. Assim, o parasita modula a apoptose da célula hospedeira o que pode ser crítico para o curso da infecção (LUDER e GROSS, 2005).

1.4 - Toxoplasmose

A toxoplasmose é a protozoonose causada por *T. gondii* e é uma das zoonoses com maior difusão mundial, possui grande importância na saúde pública e acredita-se que cerca de 500 milhões de pessoas em todo mundo

apresentam reação sorológica positiva para o parasito (MONTROYA e LIESENFELD, 2004; ELSHEIKHA, 2008; MAROBIN *et al.*, 2004), mas sua incidência é maior em áreas tropicais e diminui com o aumento da latitude (PETERSEN, 2007).

A infecção é comum na América Central e do Sul, 50-80% dos indivíduos são soropositivos para anticorpos IgG contra *T. gondii*, e um estudo no Brasil encontrou que a soroprevalência é alta, variando de 49,2% para 91,6%, em populações com piores condições socioeconômicas (BAHIA-OLIVEIRA *et al.*, 2003; PETERSEN, 2007).

Soroprevalências muito altas (36-92%) foram encontradas em mulheres grávidas no Brasil. Estes dados indicam que a soroprevalência de *T. gondii* em crianças e em mulheres grávidas é um dos mais elevados do mundo (DUBEY and BEATTIE, 1988; TENTER *et al.*, 2000; DUBEY, 2010). Até 32% das crianças 0-5 anos, 19,5-59% das 6-10 anos de idade, e 28,4-84% das 11-15 anos de idade no Brasil eram soropositivas. Os dados indicam que, em certas áreas, aproximadamente 50% das crianças pré-adolescentes tinham sido expostas ao parasita.

A razão para a diferença na prevalência da toxoplasmose no mundo é atribuída a vários fatores, tais como o consumo de carne crua ou mal cozida, condição socioeconômica, condições climáticas, hábitos higiênicos e culturais e fatores genéticos do hospedeiro (MONTROYA e LIESENFELD, 2004; BOYER *et al.*, 2005; PETERSEN, 2007; ELSHEIKHA, 2008). A doença pode causar importantes alterações neonatais, lesões oculares, microcefalia, hidrocefalia, calcificações cerebrais, alterações psicomotoras e retardo mental, tornando a infecção primária na gestante e, conseqüentemente a infecção do feto por via transplacentária, considerando o aspecto mais grave da toxoplasmose humana (LUCAS *et al.*, 1998).

Quase todas as espécies de animais homeotérmicos são susceptíveis ao protozoário *T. gondii* (ainda que em diferentes graus). A toxoplasmose foi comprovada em todas as áreas zoogeográficas em cerca de 200 espécies de mamíferos e em muitas espécies de aves (HILL *et al.*, 2005). Nos animais, a toxoplasmose adquire importância, principalmente porque quando esses são infectados servem de fonte direta ou indireta de infecção ao homem, além de causar danos diretos aos animais de interesse econômico e de estimação. O

parasito se deposita na musculatura e pode infectar o homem pela ingestão de carne crua ou mal cozida (OLIVEIRA *et al.*, 2001).

O curso da doença se dá em dois estágios: fase aguda onde há um predomínio de taquizoítas, que se multiplicam rapidamente e invadem novas células provocando algumas manifestações clínicas como febre, dor de garganta, linfadenopatia, mialgia, astenia, cefaleia e coriorretinite, que podem ocorrer; e a fase crônica onde há o predomínio de cistos teciduais contendo bradizoítas no seu interior, e a resposta imunológica do hospedeiro contra o parasito torna-se mais eficaz, devido a imunidade adaptativa. Na toxoplasmose, em pacientes imunocomprometidos (HIV positivos, pacientes em tratamento quimioterápico, indivíduos transplantados ou indivíduos com doenças auto-imunes) a manifestação da doença quase sempre ocorre como resultado da reativação de cistos pré-existentes. Neste contexto, os bradizoítas voltam ao estágio de taquizoítas, podendo levar o paciente a óbito (MONTROYA e LIESENFELD, 2004).

Manifestações clínicas e gravidade da doença estão diretamente relacionadas com interações entre parasito e hospedeiro, o que inclui: quantidade e via de inóculo, imunidade, virulência da cepa, genótipo, idade e integridade de mucosas e barreiras epiteliais do hospedeiro (RONMAN *et al.*, 2006). *Toxoplasma gondii* é capaz de infectar uma grande variedade de tipos celulares, incluindo células epiteliais e células do sistema fagocitário (JOINER e DUBREMETZ, 1993). A invasão celular ativa leva cerca de 15 a 20 segundos, em que envolve o processo de reconhecimento, adesão e mecanismos de defesa.

A infecção pelo parasito é assintomática na maioria dos adultos e crianças, sendo que apenas aproximadamente 10% dos casos apresentam sintomas não-específicos que raramente precisam de tratamento (MONTROYA e LIESENFELD, 2004; DUBEY e JONES, 2008). No entanto, a doença é considerada um problema de saúde pública, pois desenvolve um quadro preocupante em pacientes imunocomprometidos (por exemplo, pacientes com AIDS ou aqueles submetidos à terapia de droga imunossupressora para o câncer ou para o transplante de órgãos) e em casos de infecção congênita. A infecção pelo *Toxoplasma gondii* pode causar complicações graves, como encefalite necrosante, pneumonite e miocardite (BARBOSA *et al.*, 2007; CARRUTHERS e

SUZUKI, 2007; NOVOSELOV *et al.*, 2007), até mesmo a morte (CASTILHO-PELLOSO *et al.*, 2007; YUAN *et al.*, 2007).

O tratamento atual para toxoplasmose aguda exige uma abordagem combinada, que utiliza Pirimetamina e Sulfadiazina, ambos inibidores de folato. Em certas circunstâncias, Clindamicina, um inibidor de síntese de proteínas, pode também ser indicado. No entanto, os fármacos atualmente disponíveis têm uma variedade de efeitos colaterais incluindo a intolerância (MONTROYA e LIESENFELD, 2004). A terapia Antifolato é normalmente mal tolerada ou causa reações alérgicas nos pacientes (CARRUTHERS, 2006), e também já foi relatado a resistência a alguns dos fármacos clássicos de tratamento em *T. gondii* (BAATZ *et al.*, 2006) bem como outros apicomplexas como o *Plasmodium falciparum* notavelmente resistente a Pirimetamina (MITA *et al.*, 2009). Portanto, é importante descobrir novos medicamentos ou ferramentas que possibilitem a descoberta de possíveis alvos capazes de atuar sobre o parasita.

1.5 – Peçonhas ofídicas

Venenos animais, sobretudo as peçonhas ofídicas têm sido alvo de vários estudos que demonstram o seu potencial terapêutico (PASSERO *et al.*, 2008; COSTA *et al.*, 2008; FERNÁNDEZ *et al.*, 2010; CARREGARI *et al.*, 2012; NUNES *et al.*, 2013; CASTANHEIRA *et al.*, 2015; de MOURA *et al.*, 2014; RODRIGUES *et al.*, 2015)

As peçonhas das serpentes são provavelmente, as mais complexas de todas as peçonhas animais conhecidas, contendo 20 ou mais componentes diferentes, sendo que mais de 90% do seu peso seco corresponde a proteínas, com uma grande variedade de enzimas (CALVETE *et al.*, 2007). Contudo, sua composição pode diferir de um indivíduo para outro, podendo ser de uma mesma espécie ou de espécies diferentes. Dentre seus principais componentes, destacam-se metaloproteases, serinoproteases, desintegrinas, fosfolipases A₂, L-amino oxidases, fosfomonoesterases, fosfodiesterases, acetilcolinesterase, arginina esterase, hialuronidase, 5'- nucleotidase e NAD-nucleosidase (STOCKER, 1990)

Toxinas animais e seus derivados têm sido largamente utilizados na descoberta de fármacos e conduzem ao desenvolvimento de muitos agentes

terapêuticos (TEMPONE *et al.*, 2007). 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.

Alguns componentes presentes em peçonhas ofídicas já foram isolados, estudados e são utilizados como medicamentos para o tratamento de diferentes distúrbios metabólicos. Peptídeos potencializadores de Bradicinina (BPPs) encontrados na peçonha de *Bothrops jararaca*, por exemplo, 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). A batroxobina (Reptilase®, Pentapharm, Basel, Switzerland), é uma enzima “thrombin-like” que foi purificada a partir da peçonha de *Bothrops atrox*. Essa enzima possui ação desfibrinogênica e é útil no tratamento de doenças cardiovasculares, como trombose e outras coagulopatias (MARSH e WILLIAMS, 2005).

Durante os últimos 30 anos, tem havido um crescente interesse no isolamento e caracterização estrutural e funcional de fosfolipases A₂ presentes em peçonhas de serpentes (RODRIGUES *et al.*, 1998; RODRIGUES *et al.*, 2004; RODRIGUES *et al.*, 2007; NUNES *et al.*, 2013; FERREIRA *et al.*, 2013; RODRIGUES *et al.*, 2015).

Estas enzimas são responsáveis por uma variedade de efeitos tóxicos e farmacológicos. Dentre seus efeitos mais comuns estão: miotoxicidade e edema, indução ou inibição da agregação plaquetária, neurotoxicidade, efeito hipotensor, bactericida e citotoxicidade (FRANCISCHETTI *et al.*, 1998; KINI, 2003; MASUDA *et al.*, 2005; STÁBELI *et al.*, 2006; RODRIGUES *et al.*, 2007; SANTOS-FILHO *et al.*, 2008; FERNÁNDEZ *et al.*, 2010). Vários autores dedicam seus esforços no sentido de elucidar o mecanismo de ação das fosfolipases A₂ sobre diferentes tipos celulares.

A ação *in vitro* das PLA₂s foi verificada em alguns parasitas, como em formas promastigota de *Leishmania* sp. Stábeli e colaboradores (2006) demonstraram que MjTx-II, uma PLA₂ Lys-49, isolada da peçonha de *B. moojeni*

foi capaz de reduzir aproximadamente 50% da população de *Leishmania* sp. (*L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) braziliensis*, *L. (L.) major* e *L. (L.) donovani*).

1.6 - Fosfolipase A₂: Tipos, estrutura e mecanismos de ação

É bem conhecido que fosfolipases A₂ (PLA₂s) desempenham um papel importante no metabolismo à ação intrínseca lipolítica. A hidrólise de lipídeos da membrana celular promove a perda de sua estrutura, prejudicando assim a sua permeabilidade seletiva. A hidrólise ocorre especificamente na ligação 2-acil-éster, libertando ácidos graxos livres e lisofosfolipídios (KINI *et al.*, 2003; HIGUCHI *et al.*, 2007). Ambos os produtos da ação catalítica, representam precursores de moléculas de sinalização que podem exercer uma multiplicidade de funções biológicas, como a regulação do sono, as respostas imunes, inflamação, a percepção da dor e proliferação celular, sobrevivência e migração (COSTA *et al.*, 2008)

PLA₂s foram subdivididas em quinze grupos de acordo com a origem, massa relativa e quantidade de ligações dissulfeto, sendo que as PLA₂ das peçonhas de serpentes estão incluídas nos grupos IA e IIA (SCHALOSKE e DENNIS, 2006). O grupo I inclui a família Elapidae e grupo II as famílias Viperidae e Crotalidae (DENNIS, 1994). PLA₂s isoladas dessas peçonhas que pertencem ao grupo II são subdivididos em dois grupos principais: (i) PLA₂s Asp49, que exibem um resíduo Asp na posição 49, com relativamente elevada atividade catalítica sobre substratos artificiais; (ii) variantes PLA₂s Lys49, mostrando um resíduo Lys na posição 49, com baixa ou nenhuma atividade catalítica.

A falta de atividade hidrolítica nas PLA₂.Lys49 foi atribuído inicialmente à presença do átomo de Lys localizado na posição 49 ocupada pelo Ca²⁺ na PLA₂s-Asp49 (ARNI e WARD, 1996; OWNBY *et al.*, 1999; SOARES *et al.*, 2004). Porém estudos de mutagênese com uma PLA₂-Lys49 mostraram que o mutante Lys49Asp permaneceu cataliticamente inativo (WARD *et al.*, 2002), demonstrando que não apenas a única substituição Asp49Lys, mas também outras modificações estruturais possíveis são responsáveis pela ausência da atividade enzimática. Todas as PLA₂s catalíticas apresentam um resíduo de

tirosina na posição 28, ao passo que uma asparagina ocupa esta posição em PLA₂-Lys49. Uma análise estrutural de Tyr28 em PLA₂s revela uma característica importante para a estabilidade de Ca²⁺ no sítio de ligação do cálcio com o qual está associado. Quando ocorre a mutação, este sítio se abre impossibilitando a ligação do íon. Assim, a inatividade catalítica das PLA₂-Lys49 pode ser explicada por duas substituições, Y28N e D49K (FERNANDES *et al.*, 2010)

As PLA₂s-Asp49 e Lys49 mostram semelhanças significativas em suas estruturas tridimensionais, embora exibindo diferentes propriedades farmacológicas, o que os torna alvos interessantes para muitas pesquisas.

A arquitetura molecular, bem como a maquinaria catalítica das PLA₂s de peçonhas de serpentes são altamente conservadas (DENNIS *et al.*, 2011; GUTIÉRREZ e LOMONTE, 2013). No entanto, alterações sutis nos resíduos de aminoácidos expostos à superfície durante a evolução permitiram que as PLA₂s desencadeassem um amplo espectro de efeitos biológicos, adaptando gradualmente para o reconhecimento de alvos moleculares específicas, portanto, interferindo em diferentes processos fisiológicos (LOMONTE *et al.*, 2009).

PLA₂s são proteínas relativamente pequenas (~13-14 kDa) e possuem catorze resíduos de Cys conservados que formam sete pontes dissulfeto, um padrão estrutural relevante para a estabilização da estrutura tridimensional (SCHALOSKE e DENNIS, 2006). Estas enzimas são constituídas por três grandes α -hélices e duas β -folhas anti-paralelas, que são mantidas juntas por pontes dissulfeto. As estruturas conservadas nas PLA₂s são uma α - hélice na região N- terminal, um *loop* de ligação ao cálcio, hélice anti-paralela, local ativo, e uma volta β (DENNIS *et al.*, 2011). (Figura 3A)

PLA₂s dos grupos I e II apresentam uma rede catalítica conservada formada por quatro resíduos de aminoácidos: His48, Asp49, Tyr52 e Asp99, ao lado de resíduos do "sítio de ligação do cálcio" e um resíduo de aminoácido importante, Asp49, que coordena o íon Ca²⁺, o qual desempenha um papel crucial para a atividade enzimática (YU *et al.*, 1994; PETAN *et al.*, 2007). Durante o mecanismo catalítico, o íon Ca²⁺, impulsiona o reconhecimento do substrato no sítio ativo, polariza a ligação éster cindível e estabiliza o estado de transição (SCOTT *et al.*, 1990). (Figura 3B)

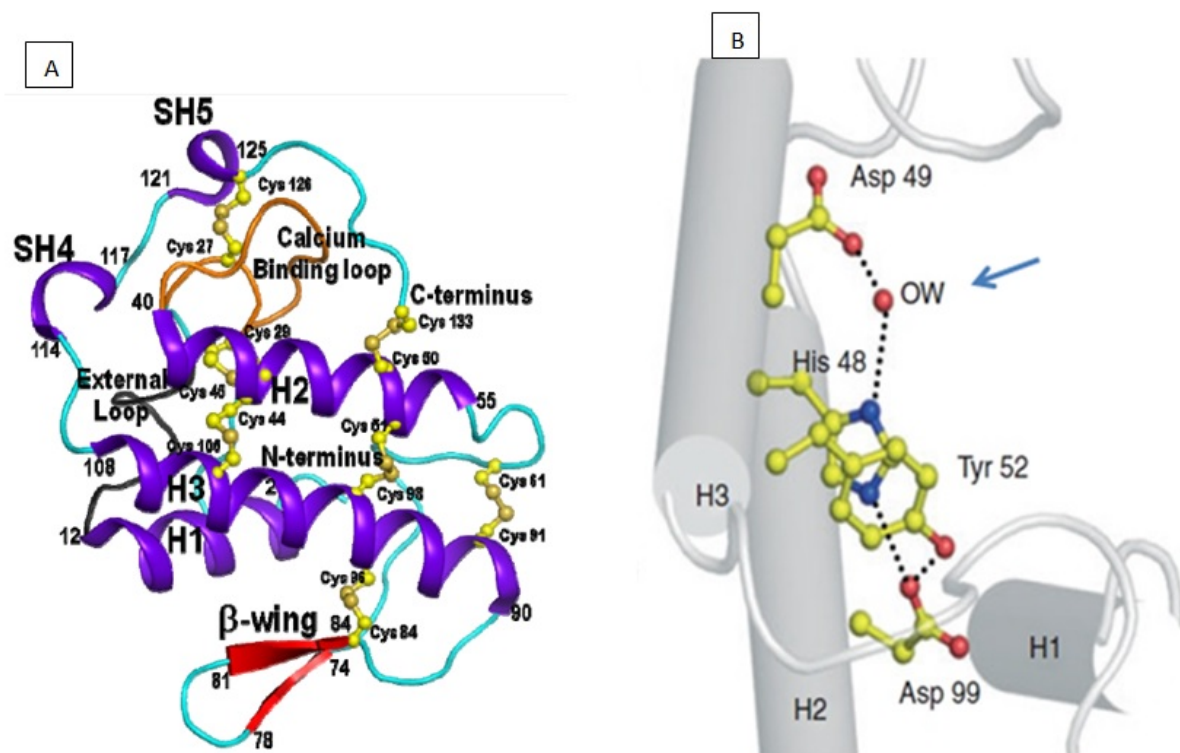


Figura 3: representação estrutural tridimensional das fosfolipases. A- estrutura do grupo II; B- sítio catalítico. Fonte: (Kang et al., 2011)

Muitas PLA₂s de peçonha de serpente tem uma forte tendência a formar oligômeros. A maioria das PLA₂ podem formar dímeros quando analisadas por eletroforese e, conseqüentemente, a maioria das suas estruturas foram resolvidas como homodímeros (ARNI *et al.*, 1995; MAGRO *et al.*, 2003; SOARES *et al.*, 2004). PLA₂s-Lys49 botrópicas são as proteínas mais estudadas deste grupo, e vários experimentos com estas miotoxinas, demonstraram que são proteínas diméricas em solução (DA SILVA GIOTTO *et al.*, 1998; ARNI *et al.*, 1999; MURAKAMI *et al.*, 2007; FERNANDES *et al.*, 2010).

A dissociação de PLA₂ em monômeros demonstrou ser prejudicial para as suas atividades biológicas (DE OLIVEIRA *et al.*, 2001; ANGULO *et al.*, 2005), a sua montagem oligomérica parece ser relevante para a sua toxicidade. Estudos de dissociação induzida por pH, demonstraram uma diminuição considerável da atividade de danificar a membrana, após a dissociação dimérica (ANGULO *et al.*, 2005). O estado dimérico também se encontra *in vivo*, e é estável mesmo

após aquecimento na presença de b-mercaptoetanol (GIOTTO DA SILVA *et al.*, 1998; SOARES *et al.*, 2000).

A primeira estrutura de uma PLA₂s-Lys49 do gênero *Bothrops* foi resolvida por ARNI *et al.* (2005) e posteriormente várias outras estruturas foram resolvidas (DA SILVA GIOTTO *et al.*, 1998; LEE *et al.*, 2001; MAGRO *et al.*, 2003; WATANABE *et al.*, 2005). Todas estas estruturas adotaram uma conformação dimérica comum (dímero convencional). Porém da Silva-Giotto *et al.* (1998) resolveram a estrutura da BthTX-I e apresentaram duas estruturas com diferentes ângulos de abertura entre os monômeros, referidos como conformações "aberta" e conformações "fechadas". Magro *et al.* (2003) através de análises de oito estruturas de PLA₂s-Lys49 observaram que estas proteínas poderiam adotar muitas conformações devido à flexibilidade entre os monômeros e com base nesses dados foi proposto um novo modelo para a estrutura dimérica das PLA₂s-Lys49, referido como "dímero alternativo".

Um mecanismo abrangente para PLA₂s-Lys49 foi proposto, em uma revisão de Fernandes *et al.* (2014), onde os autores relataram a presença de duas regiões conservadas na maioria PLA₂s-Lys49: o "cationic membrane-docking site" (MDoS), formado pelos resíduos C-terminais estritamente conservados (Lys115 e Arg118), eventualmente auxiliado por outros resíduos catiônicos expostos tais como Lys20, Lys80, Lys122 e Lys127; e do "hydrophobic membrane-disruption site" (MDiS), formado por resíduos de Leu e Phe. Este mecanismo envolve uma transição alostérica e a participação de dois sítios de interação independente com a membrana alvo e inclui a ligação de um ácido graxo no canal hidrofóbico, o que leva a transição alostérica e estabilização da estrutura, expondo MDoS e MDiS para as membranas.

A BnSP-7 é uma fosfolipase A₂ isolada a partir da peçonha de *Bothrops pauloensis* (SOARES *et al.*, 2000). Essa toxina é cataliticamente inativa (Lys-49), com massa molecular de cerca de 14 kDa, e ponto isoelétrico de 8,8. BnSP-7 também é dimérica e a sua estrutura é essencialmente idêntica a estruturas de outras PLA₂s-Lys49, apresentando sete pontes de dissulfeto, aminoácidos compostos por resíduos básicos e hidrofóbicos, N-terminal composto por um resíduo de serina e resíduos de Gly30, Gly33, His48, Asp 99 conservados em sua estrutura (RODRIGUES *et al.*, 1998; SOARES *et al.*, 2000; MAGRO *et al.*, 2003) (Figura 4). Com relação a suas propriedades farmacológicas, esta enzima

induz necrose de fibras musculares, edema, libera creatina quinase do músculo gastrocnêmico de camundongos e apresenta atividade bactericida sobre *Escherichia coli* (RODRIGUES *et al.*, 1998; SOARES *et al.*, 2000; MAGRO *et al.*, 2003) dentre outras atividades (RODRIGUES *et al.*, 2015).

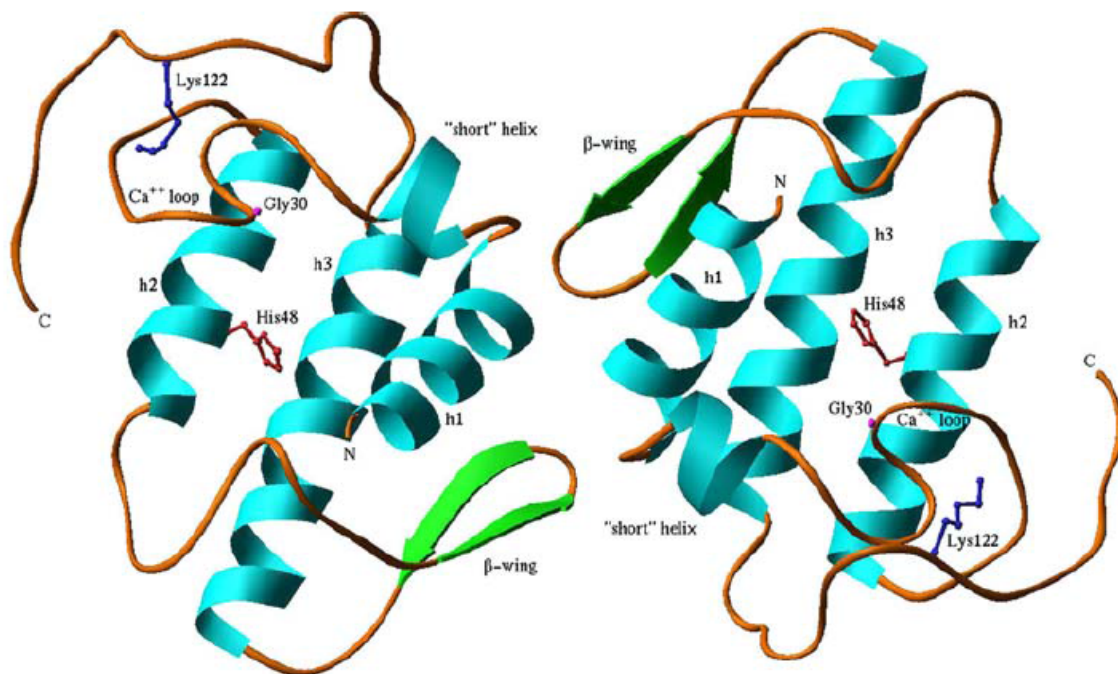


Figura 4: Diagrama de fita demonstrando a estrutura de BnSP-7 (Magro *et al.*, 2003)

Estudos com peptídeos sintéticos derivados principalmente da região C-terminal (115-129) de PLA₂s têm demonstrado resultados promissores para se buscar a correlação entre estrutura e função dessas moléculas. (NUNEZ *et al.*, 2001; LOMONTE *et al.*, 2003). Esta região combina aminoácidos catiônicos e hidrofóbicos responsáveis por causar danos as membranas celulares. Os resíduos catiônicos podem interagir eletrostaticamente com grupos aniônicos em um local de fosfolípidos da membrana, possivelmente carregado negativamente (LOMONTE *et al.*, 2003), enquanto que os resíduos hidrofóbicos, especialmente os aromáticos, podem interagir e possivelmente penetrar na bicamada fosfolipídica, resultando na sua desestabilização (NUNEZ *et al.*, 2001).

No entanto, o fato de que um único peptídeo possa exercer todas as principais atividades tóxicas da molécula de origem, não impede a existência de outras regiões que possam participar ou complementar a ação deste sítio tóxico (LOMONTE *et al.*, 2003).

1.7 – Ação anti-Toxoplasma de toxinas de *Bothrops pauloensis*:

A ação de toxinas sobre *Toxoplasma gondii* ainda é pouco estudada. Castanheira e colaboradores (2015), mostraram a ação de uma lectina tipo C (BpLec) isolada da peçonha de *B. pauloensis* sobre formas taquizoítas de *Toxoplasma gondii*. Os autores mostraram que a BpLec foi capaz de reduzir o parasitismo de *T. gondii* após o tratamento em formas taquizoítas, diminuindo tanto adesão quanto a proliferação do parasita, quando tratados antes da infecção. Bastos e colaboradores (2008) mostraram que uma metaloprotease isolada de *Bothrops neuwiedi*, quando utilizada para o tratamento de células previamente infectadas ou sobre o parasita antes da infecção, apresentou níveis de inibição da infecção de 71 % e 61%, respectivamente.

Estudos que busquem demonstrar o papel de toxinas animais sobre *T. gondii* se mostram promissores. PLA₂s de peçonhas de serpentes são moléculas promissoras para aplicação biotecnológica e terapêutica devido ao seu potencial antiplaquetário, antitumoral, antimicrobiano, antiparasitários, dentre outros (NUNES *et al.*, 2013). Além disso, podem ser utilizadas como ferramenta na busca de possíveis alvos para se desvendar o mecanismo de ação de doenças e desvendar causas de morte em parasitas, servindo como um modelo de estudo para ação de outras drogas.

Esses estudos e a grande variedade de efeitos biológicos atribuídos às PLA₂s nos levou a pesquisar suas propriedades anti-parasitária, com o objetivo de revelar novos efeitos moleculares específicos e/ou alvos metabólicos compatíveis com perspectivas de futuro na terapia.

Referências Bibliográficas

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.

AMBROSIO, A.L.B.; NONATO, M.C.; SELISTRE DE ARAUJO, H.S.; ARNI, R.K.; WARD, R.J.; OWNBY, C.L.; DE SOUZA, D.H.F.; GARRAT, R.C. A molecular mechanism for Lys49-phospholipase A₂ activity based on ligand-induced conformational change. **J. Biol. Chem**, v. 280, p. 7326–7335, 2005.

AMENDOEIRA, M. R. R. Mecanismos de transmissão da toxoplasmose. **Anais Academia Nacional Medicina**, v. 155, p. 224-225, 1995.

ANGULO, Y.; GUTIÉRREZ, J.M.; SOARES, A.M.; CHO, W.; LOMONTE, B. Myotoxic and cytolytic activities of dimeric Lys49 phospholipase A₂ homologues are reduced, but not abolished, by a pH-induced dissociation, **Toxicon**, v.46 p. 291–296, 2005.

ARNI, R.K.; WARD, R.J.; GUTIERREZ, J.M.; TULINSKY, A. Structure of a calcium independent phospholipase-like myotoxic protein from *Bothrops asper* venom, **Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.** v.51, p.311–317, 1995.

ARNI, R.K.; FONTES, M.R.; BARBERATO, C.; GUTIÉRREZ, J.M.; DÍAZ, C.; WARD, R.J. Crystal structure of myotoxin II, a monomeric Lys49-phospholipase A₂ homologue isolated from the venom of Cerrophidion (Bothrops) godmani, **Arch. Biochem. Biophys.** v. 366, p.177–182, 1999.

ARNI, R.K.; WARD, R.J. Phospholipase A₂—a structural review. **Toxicon**, v. 34, p. 827–841, 1996.

BARBOSA, C.J.; MOLINA, R.J.; SOUZA, M.B.; SILVA, A.C.; MICHELETTI, A.R.; REIS, M.A.; TEIXEIRA, V.D.; SILVA-VERGARA, M.L.. Disseminated toxoplasmosis presenting as sepsis in two AIDS patients. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, v. 49, p. 113–116, 2007.

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.

BESTEIRO, S. Which roles for autophagy in *Toxoplasma gondii* and related apicomplexan parasites? **Molecular & Biochemical Parasitology**, v. 184, p. 1–8, 2012.

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

BOGDAN, C.; NATHAN, C. Modulation of macrophage function by transforming growth factor beta, interleukin-4, and interleukin-10. *Ann N Y Acad Sci.*, **United States**, v. 685, p. 713–39, 1993.

BOHNE, W.; HEESEMANN, J.; GROSS, U. Induction of bradyzoite-specific *Toxoplasma gondii* antigens in gamma interferon treated mouse macrophages. **Infect. Immun.**, Wurzburg, v. 31, p. 1141–1145, 1993.

BOYER, K. M.; HOLFELS, E.; ROIZEN, N.; SWISGER, C.; MACK, D.; REMINGTON, J.; WITHERS, S.; MEIER, P.; McLEOD, R. Risk factors for *Toxoplasma gondii* infection in mothers of infants with congenital toxoplasmosis: implications for prenatal management and screening. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 192, p. 564–571, 2005.

CALVETE, J. J.; JUÁREZ, P.; SANZ, L. Snake venomomics. Strategy and applications. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 42, p. 1405–1414, 2007

CARREGARI, V.C; FLORIANO, R.S; RODRIGUES-SIMIONI, L.; WINCK, F.V.; BALDASSO, P.A.; PONCE-SOTO, L.A.; MARANGONI, S. Biochemical, Pharmacological, and Structural Characterization of New Basic PLA2 Bbil-TX from *Bothriopsis bilineata* Snake Venom. **BioMed Research International**, v. 2013, p.1-12.

CASTANHEIRA, L.E.; DE SOUZA, D.L.N.; SILVA, R.J.; BARBOSA, B.; MINEO, J.R.; TUDINI, K.A.; RODRIGUES, R.; FERRO, E.V.; RODRIGUES, V.M. Insights into anti-parasitism induced by a C-type lectin from *Bothrops pauloensis* venom on *Toxoplasma gondii*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 74, p. 568–574, 2015.

CASTILHO-PELLOSO, M.P.; FALAVIGNA, D.L.; FALAVIGNA-GUILHERME, A.L. Suspected acute toxoplasmosis in pregnant women. **Revista de Saude Publica**, v. 41, p. 27–34, 2007.

CARRUTHERS, V. B. Armed and dangerous: *Toxoplasma gondii* uses an arsenal of secretory proteins to infect host cells. **Parasitology International**, Amsterdam, v. 48, p. 1-10, 1999.

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

CARRUTHERS, V.B.; SUZUKI, Y. Effects of *Toxoplasma gondii* Infection on the Brain. **Schizophrenia Bulletin**, v.33, p. 745–751, 2007.

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.

Centers for Disease Control and Prevention, 2015. Disponível em: <http://www.cdc.gov/parasites/toxoplasmosis/biology.html>, acesso em 26 maio.2015

CHERWINSKI, H.M.; SCHUMACHER, J.H.; BROWN, K.D.; MOSMANN, T.R.

Two types of mouse helper T cell clone. III. Further differences in lymphokine synthesis between Th1 and Th2 clones revealed by RNA hybridization, functionally monospecific bioassays, and monoclonal antibodies. **J Exp Med**, v.166, p. 1229-44, 1987.

COSTA, F.L.; RODRIGUES R.S.; IZIDORO, L.F.; MENALDO, D.L.; HAMAGUCHI, A.; HOMSI-BRANDEBURGO, M.I.; FULY, A.L.; SOARES, S.G.; SELISTRE-DE-ARAÚJO, H.S.; BARRAVIERA B, SOARES A.M.; RODRIGUES, V.M. Biochemical and functional properties of a thrombin-like enzyme isolated from *Bothrops pauloensis* snake venom. **Toxicon**, v. 54, p.725-735, 2008.

DA SILVA GIOTTO, M.T.; GARRAT, R.C.; OLIVA, G.; MASCARENHAS, Y.P.; GIGLIO, J.R.; CINTRA, A.C.O.; DE AZEVEDO JR.; W.F.; ARNI, R.K.; WARD, R.J. Crystallographic and spectroscopic characterization of a molecular hinge: conformational changes in bothropstoxin I, a dimeric Lys49 phospholipase A₂ homologue. **Prot. Struct. Funct. Genet**, v. 30, p. 442–454, 1998.

DENKERS, E. Y. From cells to signaling cascades: manipulation of innate immunity by *Toxoplasma gondii*. **FEMS Immunol. Med. Microbiol**, v, 39, p. 193-203, 2003.

DE OLIVEIRA, A.H.; GIGLIO, J.R.; ANDRIÃO-ESCARSO, S.H.; ITO, A.S.; WARD, R.J. A pH-induced dissociation of the dimeric form of a lysine 49-phospholipase A₂ abolishes Ca²⁺-independent membrane damaging activity, **Biochemistry**, v. 40 p. 6912–6920, 2001.

de Moura, A.A.; Kayano, A.M.; Oliveira, G.A.; Setúbal, S.S.; Ribeiro, J.G.; Barros, N.B.; Nicolete, R.; Moura, L.A.; Fuly, A.L.; Nomizo, A.; da Silva, S.L.; Fernandes, C.F.C.; Zuliani, J.P.; Stábeli, R.G.; Soares, A.M.; Calderon, L.A. Purification and Biochemical Characterization of Three Myotoxins from *Bothrops matogrossensis* Snake Venom with Toxicity against *Leishmania* and Tumor Cells. **BioMed Research International**, v. 2014, p.1-13.

DING, A. H.; NATHAN, C. F.; STUEHR, D. J. Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. **J. Immunol**, v. 141, p. 2407-2412, 1988.

DOS SANTOS, J.I.; SOARES, A.M.; FONTES, M.R.M. Comparative structural studies of Lys49-phospholipases A₂ from Bothrops genus reveal their myotoxic site. **J. Struct. Biol**, v. 167, p. 106–116, 2009.

DUBEY, J. P.; BEATTIE, C. P. Toxoplasmosis of Animals and Man. **CRC Press, Boca Raton**, 1988.

DUBEY, J. P.; THULLIEZ, P. Persistence of tissue cysts in edible tissues of cattle fed *Toxoplasma gondii* oocysts. **American Journal of Veterinary Research**, v. 54, p. 270 - 273, 1993.

DUBEY, J. P.; FRENKEL, J. K. Toxoplasmosis of rats: a review, with considerations of their value as an animal model and their possible role in epidemiology. **Veterinary Parasitology**, v. 77, p. 1- 32, 1998.

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

DUBEY, J.P.; JONES, J.L. *Toxoplasma gondii* infection in humans and animals in the United States. **International Journal for Parasitology**, v. 38, p. 1257–1278, 2008.

DUBEY, J. P.; RAJENDRAN, C.; COSTA, D. G. C.; FERREIRA, L. R., KWOK, O. C. H., QU, D.; SU, C.; VARVULO, M. F. V.; ALVES, L. C.; MOTA, R. A. SILVA, J. C. R. New *Toxoplasma gondii* genotypes isolated from free-range chickens from the Fernando de Noronha, Brazil: unexpected findings. **Journal of Parasitology**, v. 96, p. 709–712, 2010.

DUMETRE, A.; LE BRAS, C.; BAFFET, M.; MENECEUR, P.; DUBEY, J. P.; DEROUIN, F.; DUGUET, J. P.; JOYEUX, M.; MOULIN, L. Effects of ozone and ultraviolet radiation treatments on the infectivity of *Toxoplasma gondii* oocysts. **Veterinary Parasitology**, v. 153, n. 3-4, p. 209-213, 2008.

EDWARDS, S. H.; THOMPSON, D.; BAKER, S. F.; WOOD, S. P.; WILTON, D. C. The crystal structure of the H48Q active site mutant of human group IIA secreted phospholipase A₂ at 1.5 Å resolution provides an insight into the catalytic mechanism. **Biochemistry**, v. 41, p. 15468-15476, 2002.

ELSHEIKHA, H.M. Congenital toxoplasmosis: priorities for further health promotion action. **Public Health**, v. 122, p. 335-353, 2008.

FERREIRA, F. B.; GOMES, M. S.; DE SOUZA, D. L.; GIMENES, S. N.; CASTANHEIRA, L. E.; BORGES, M. H.; RODRIGUES, R. S.; YONEYAMA, K. A.; BRANDEBURGO, M. I.; RODRIGUES, V. M. Molecular cloning and pharmacological properties of an acidic PLA₂ from *Bothrops pauloensis* snake venom. **Toxins**, v. 5, p. 2403-2419, 2013.

FERNANDES, C.A.H.; MARCHI-SALVADOR, D.P.; SALVADOR, G.M.; SILVA, M.C.O.; COSTA, T.R.; SOARES, A.M. Comparison between apo and complexed structures of bothropstoxin-I reveals the role of Lys122 and Ca²⁺-binding loop region for the catalytically inactive Lys49–PLA₂s, **J. Struct. Biol.** v.171, p.31–43, 2010.

FERNÁNDEZ, J.; GUTIÉRREZ, J. M; ÂNGULO, Y.; SANZ, L.; JUÁREZ, P.; CALVETE, J. J.; LOMONTE, B.; Isolation of an acidic phospholipase A₂ from the venom of the snake *Bothrops asper* of Costa Rica: Biochemical and toxicological characterization. **Biochimie**, p. 273-283, 2010.

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

FRANCISCHETTI, I. M. B.; CASTRO, H. C.; ZINGALI, R. B.; CARLINI, C. R.; GUIMARAES, J. A. *Bothrops* sp. Snake venoms: comparison of some biochemical and physicochemical properties and interference in platelet functions. **Comp. Biochem. Physiol**, v. 119, p. 21-29, 1998.

GAZZINELLI, R.T.; ELTOUM, I.; WYNN, T.A.; SHER, A. Acute cerebral toxoplasmosis is induced by in vivo neutralization of TNF-alpha and correlates with the down-regulated expression of inducible nitric oxide synthase and other markers of macrophage activation. **J Immunol**, v.151, p. 3672-3681, 1993.

GROSS, U.; HOLPERT, M.; GOEBEL, S. Impact of stage differentiation on diagnosis of toxoplasmosis. **Annali Dell Istituto Superiore di Sanità**, v. 40, p. 67-70, 2004.

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.

HESELER, K.; SPEKKER, K.; SCHMIDT, S. K.; MacKENZIE, C. R.; DAUBENER, W. Antimicrobial and immunoregulatory effects mediated by human lung cells: role of IFN-γ-induced tryptophan degradation. **FEMS Immunol. Med. Microbiol**, v. 52, p. 273-281, 2008.

HIGUCHI, D. A.; BARBOSA, C. M. V.; BINCOLETTTO, C.; CHAGAS, J. R.; MAGALHAES, A.; RICHARDSON, M.; SANCHEZ, E. F.; PESQUERO, J. B.; ARAUJO, R. C.; PESQUERO, J. L. Purification and partial characterization of two phospholipase A₂ from *Bothrops leucurus* (white-tailed-jararaca) snake venom. **Biochemie**, v. 89, p. 319-328, 2007.

HILL, D. E.; CHIRUKANDOTH, S.; DUBEY, J. P. Biology and epidemiology of *Toxoplasma gondii* in man and animals. **Animal Health Research Reviews**. v. 6, p. 41-61, 2005.

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

HUNTER, C. A.; SUBAUSTE, C. S.; VAN CLEAVE, V. H.; REMINGTON, J. S. Production of gamma interferon by natural killer cells from *Toxoplasma gondii*-infected SCID mice: regulation by interleukin-10, interleukin-12, and tumor necrosis factor alpha. **Infect. Immun**, v. 62, p. 2818-2824, 1994.

JEFFREY, D.; KRAVETZ, M. D.; DANIEL, G.; FEDERMAN, M. D. Toxoplasmosis in pregnancy. **The American Journal of Medicine**, v. 118, p. 212-216, 2005.

JOINER, K. A.; DUBREMETZ, J. F. *Toxoplasma gondii*: a protozoan for the nineties. **Infection and Immunity**, Bethesda, v. 61, p. 1169–1172, 1993.

KANG, T.S.; GEORGIEVA, D.; GENOV, N.; MURAKAMI, M.T; SINHA, M.; KUMAR, R. P.; KAUR, P.; KUMAR, S.; DEY, S.; SHARMA, S.; VRIELINK.; A.; BETZEL, C.; TAKEDA, S.; ARNI, R.K.; SINGH, T.P.; KINI, R. M. Enzymatic toxins from snake venom: structural characterization and mechanism of catalysis. **FEBS Journal**, v 278 p. 4544–4576, 2011

KAWAZOE, U. *Toxoplasma gondii*. In: NEVES, D. P. **Parasitologia Humana**. Ed.: Atheneu. 11a ed. Sao Paulo, p. 147-156, 2005.

KIM, K.; WEISS, L. M. *Toxoplasma gondii*: the model apicomplexan. **International Journal for Parasitology**, v. 34, n. 3, p. 423-432, 2004.

KIM K, WEISS LM. *Toxoplasma gondii*: the model apicomplexan. **Int. J. Parasitol**, v. 34, p. 423–432, 2004.

KINI, R. M. Excitement ahead: structure, function and mechanism of snake venom phospholipase A₂ enzymes. **Toxicon**, v. 42, p. 827-840, 2003.

KRAMMER, P.H. CD95's deadly mission in the immune system. **Nature, England**, v. 407, p. 789-795, 2000.

LANG, C.; GROB, U.; LUDER, C. G. K. Subversion of innate and adaptative immune responses by *Toxoplasma gondii*. **Parasitol. Res**, v. 100, p. 191-203, 2007.

LEE, W.H.; DA SILVA GIOTTO, M.T.; MARANGONI, S.; TOYAMA, M.H.; POLIKARPOV, I.; GARRATT, R.C. Structural basis for low catalytic activity in Lys49 phospholipases A₂—a hypothesis: the crystal structure of piratoxin II complexed to fatty acid, **Biochemistry** (Mosc) v.40, p.28–36, 2001.

LUCAS, S. R. R.; HAGIWARA, M. K.; RECHE Jr. A. Ocorrência de anticorpos antitoxoplasma em gatos infectados naturalmente pelo vírus da imunodeficiência dos felinos. **The Brazilian Journal Veterinary Research and Animal Science**, v. 35, p.41-45, 1998.

LÜDER, C.G.K.; GROSS, U. Apoptosis and its modulation during infection with *Toxoplasma gondii*: molecular mechanisms and role in pathogenesis. **Curr Top Microbiol Immunol**, v. 289, p. 219-37, 2005.

LOMONTE, B.; ANGULO, Y.; SANTAMARÍA, C. Comparative study of synthetic peptides corresponding to region 115-129 in Lys49 myotoxic phospholipases A₂ from snake venoms. **Toxicon**, v. 42, p. 307-312, 2003.

MAGRO, A. J., SOARES, A.M., GIGLIO, J.R., FONTES, M.R.M. Crystal structures of BnSP-7 and BnSP-6, two Lys49-phospholipases A₂: quaternary structure and inhibition mechanism insights. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 311, p. 713–720, 2003.

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

MAROBIN, L.; FLORES, M. L; RIZZATTI, B. B. Prevalência de anticorpos para *Toxoplasma gondii* em emas (*Rhea americana*) em diferentes criatórios do

Estado do Rio Grande do Sul. **The Brazilian Journal Veterinary Research and Animal Science**, v. 41, p.5-9, 2004.

MARTINS, C. S.; VIANA, J. A. Toxoplasmose o que todo profissional de saúde deve saber. **Clínica Veterinária**, v. 15, p. 33-37, 1998.

MASUDA, S.; MURAKAMI, M.; ISHIKAWA, Y.; ISHII, T.; KUDO, I. Diverse cellular localizations of secretory phospholipase A2 enzymes in several human tissues. **Biochimica et Biophysica Acta**, n. 1736, p. 200-210, 2005.

McCABE, R. E.; LUFT, B. J.; REMINGTON, J. S. Effect of murine interferon gamma on murine toxoplasmosis. **J. Infect. Dis**, v. 150, p. 961-962, 1984.

MORRISSETTE, N.S.; SIBLEY, L.S. Cytoskeleton of apicomplexan parasites. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 66, p. 21–38, 2002.

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

MOURA, M. A.; AMENDOEIRA, M. R.; BARBOSA, H. S. Primary culture of intestinal epithelial cells as a potencial model for *Toxoplasma gondii* enteric cycle studies. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Brasil, v. 104, p. 862-864, 2009.

MURAKAMI, M.T.; VIÇOTI, M.M.; ABREGO, J.R.B.; LOURENZONI, M.R.; CINTRA, A.C.O.; ARRUDA, E.Z. Interfacial surface charge and free accessibility to the PLA₂-active site-like region are essential requirements for the activity of Lys49 PLA₂ homologues, **Toxicon**, v.49, p. 378–387, 2007.

NEVES, D.P. **Parasitologia humana**. Rio de Janeiro: Atheneu, 2004

NISHIKAWA, Y.; ZHANG, H.; IBRAHIM, H. M.; UI, F.; OGISO, A.; XUAN, X. Construction of *Toxoplasma gondii* bradyzoite expressing the green fluorescent protein. **Parasitology International**, v. 57, p. 219-222, 2008.

NOVOSELOV, S.V., LOBANOV, A.V., HUA, D., KASAIKINA, M.V., HATFIELD, D.L., GLADYSHEV, V.N. A highly efficient form of the selenocysteine insertion sequence element in protozoan parasites and its use in mammalian cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, p. 7857–7862, 2007.

NUNES, D.C.; FIGUEIRA, M.M.; LOPES, D.S.; DE SOUZA, D.L.; IZIDORO, L.F.; FERRO, E.A.; SOUZA, M.A.; RODRIGUES, R.S.; RODRIGUES, V.M.; YONEYAMA, K.A. BnSP-7 toxin, a basic phospholipase A₂ from *Bothrops pauloensis* snake venom, interferes with proliferation, ultrastructure and infectivity of *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. **Parasitology**, v. 140, p.844-54, 2013

OLIVEIRA, F. C. R.; COSTA, A. J.; SABATINI, G. A. Clínica e hematologia de *Bos indicus*, *Bos taurus* e *Bubalus bubalis* inoculados com oocistos de *Toxoplasma gondii* (Apicomplexa: Toxoplasmatinae). **Ciência Rural**, v. 31, p. 621-626, 2001.

OWNBY, C. L.; SELISTRE DE ARAUJO, H. S.; WHITE, S. P.; FLETCHER, J. E. Lysine 49 phospholipase A₂ proteins. **Toxicon**, v. 37, p. 411-445, 1999.

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

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

PINON, JM.; DUMON, H.; CHEMLA, C.; FRANCK, J.; PETERSEN, E.; LEBECH, M.; ZUFFEREY, J.; BESSIERES, M. H.; MARTY, P.; HOLLIMAN, R.; JOHNSON, J.; LUYASU, V.; LECOLIER, B.; GUY, E.; JOYNSON, D.H.M.; DECOSTER, A.; ENDERS, G.; PELLOUX, H.; CANDOLFI, E. Strategy for Diagnosis of Congenital Toxoplasmosis: Evaluation of Methods Comparing Mothers and Newborns and

Standard Methods for Postnatal Detection of Immunoglobulin G, M, and A Antibodies. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, p.2267–2271, 2001.

PASSERO, L. F. D., LAURENTI, M. D., TOMOKANE, T. Y., CORBETT, C. E. P. AND TOYAMA, M.H. The effect of phospholipase A₂ from *Crotalus durissus collilineatus* on *Leishmania (Leishmania) amazonensis* infection. **Parasitology Research** v. 102, p. 1025–1033, 2008.

PETAN, T.; KRIZAJ, I.; PUNGERCAR, J. Restoration of enzymatic activity in a Ser-49 phospholipase A₂ homologue decreases its Ca²⁺-independent membrane-damaging activity and increases its toxicity. **Biochemistry** v. 46, p. 12795–12809, 2007.

RADKE, J. R.; DONALD, R. G.; EIBS, A.; JEROME, M. E.; BEHNKE, M. S.; LIBERATOR, P.; White, M. W. Changes in the expression of human cell division autoantigen-1 influence *Toxoplasma gondii* growth and development. **PLoS Pathogens**, v. 2, p. e105, 2006.

RANGEL, J.; QUESADA, O.; GUTIÉRREZ, J.M.; ANGULO, Y.; LOMONTE, B. Membrane cholesterol modulates the cytolytic mechanism of myotoxin II, a Lys49 phospholipase A₂ homologue from the venom of *Bothrops asper*. **Cell Biochem**, v. 29, p. 365–370, 2011.

REMLINGTON, J. S.; MCLEOD, R.; THULLIEZ, P.; DESMONTS, G. In: **Infectious Diseases of the Fetus and Newborn Infant, Toxoplasmosis**, 2001. Cap. 5, p. 205-345.

REY, L. Parasitologia. 3º ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 2001. 856p.

RODRIGUES V.M., SOARES A.M, MANCIN A.C., FONTES M.R., HOMSI-BRANDEBURGO M.I., GIGLIO J.R. Geographic variations in the composition of myotoxins from *Bothrops neuwiedi* snake venoms: biochemical characterization

and biological activity. **Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.** v. 121, p. 215-22, 1998.

RODRIGUES, R. S.; IZIDORO, L. F. M.; TEIXEIRA, S. S.; SILVEIRA, L. B.; HAMAGUCHI, A.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I.; SELISTRE-DE-ARAÚJO, H. S.; RODRIGUES, V. M.; MARCUSSI, S.; CAMBRAIA, R. S.; DE ARAÚJO, A. L.; MALTA-NETO, 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 A₂ from *Bothrops neuwiedi pauloensis* snake venom. **Toxicon**, v.44, p. 305-314, 2004.

RODRIGUES, R. S.; IZIDORO, L. F. M.; TEIXEIRA, S. S.; SILVEIRA, L. B.; HAMAGUCHI, A.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I.; SELISTRE-DE-ARAÚJO, H. S.; GIGLIO, J. R.; FULY, A. L.; SOARES, A. M.; RODRIGUES, V. M. Isolation and functional characterization of a new myotoxic acidic phospholipase A₂ from *Bothrops pauloensis* snake venom. **Toxic.**, v. 50, p. 153-165, 2007.

RODRIGUES, V. M.; LOPES, D.S.; CASTANHEIRA, L.E.; GIMENES, S.N. C.; DE SOUZA, D.L. N.; ACHÊ, D.C.; BORGES, I.P.; YONEYAMA, K.A.G.; RODRIGUES, R.S. *Bothrops pauloensis* Snake Venom Toxins: The Search for New Therapeutic Models. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 15, p. 670-684, 2015.

SILVA, A. V.; CUNHA, E. L. P.; MEIRELES, L. R. Toxoplasmose em ovinos e caprinos: estudo soroepidemiológico em duas regiões do Estado de Pernambuco, Brasil. **Ciência Rural**, v. 33, p. 115- 119, 2003.

SCHLÜTER, D.; LÖHLER, J.; DECKERT, M.; HOF, H.; SCHWENDEMANN, G. Toxoplasma encephalitis of immunocompetent and nude mice: immunohistochemical characterisation of Toxoplasma antigen, infiltrates and major histocompatibility complex gene products. **J Neuroimmunol**, v. 31, p. 185–198, Mar, 1991.

SHER, A.; OSWALD, I.P.; HIENY, S.; GAZZINELLI, R.T. *Toxoplasma gondii* induces a T-independent IFN-gamma response in natural killer cells that requires both adherent accessory cells and tumor necrosis factor-alpha. **J Immunol**, v.150, p. 3982-3989, 1993.

SUZUKI, Y.; ORELLANA, M.A.; SCHREIBER, R.D.; REMINGTON, J.S. Interferon- γ : the major mediator of resistance against *Toxoplasma gondii*. **Science**, v. 24, p. 516–518, 1988.

SIBLEY, L. D.; ADAMS, L. B.; FUKUTOM, Y.; KRAHENBUHL, J. L. Tumor Necrosis Factor-triggers antitoxoplasmal activity of IFN primed macrophages. **J. Immunol**, v. 147, p. 2340-2345, 1991.

SKARIAH, S.; McINTYRE, M. K.; MORDUE, D. G. *Toxoplasma gondii*: determinants of tachyzoite to bradyzoite conversion. **Parasitol. Res**, v. 107, p. 253-260, 2010.

SILVA, F.W.S.; ALVES, N.D.; AMÓRA, S. S. A.; TEXEIRA, F. H. V.; ACCIOLY, M. P.; CARVALHO, C. G.; NÓBREGA, R. M.; FILGUEIRA, K. D.; FEIJÓ, F.M.C. Toxoplasmose: uma revisão. **Ciência Animal**, v.16, p. 71-77, 2006.

SILVA, R. C.; LANGONI, H. *Toxoplasma gondii*: host-parasite interaction and behavior manipulation. **Parasitol Res**, v. 105, p. 893-898, 2009.

SOARES, A.M.; GUERRA-SÁ R.; BORJA-OLIVEIRA, C.R.; RODRIGUES, V.M.; RODRIGUES-SIMIONI L.; RODRIGUES, V.; FONTES M.R.; LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J.M., GIGLIO, J.R. Structural and functional characterization of BnSP-7, a Lys49 myotoxic phospholipase A₂ homologue from *Bothrops neuwiedi pauloensis* venom. **Arch Biochem Biophys**, v. 378, p. 201-209, 2000.

SOARES, A.M., FONTES, M.R.M., GIGLIO, J.R. Phospholipases A₂ myotoxins from *Bothrops* snake venoms: structure–function relationship. **Curr. Org. Chem.** v. 8, p. 1677–1690, 2004

SOUZA, W.; DOS SANTOS, E.; DUARTE, M.; LEMGRUBER, L.; ATTIAS, M.; VOMMARO, R.C.; Organização estrutural do taquizoíta de *Toxoplasma gondii*. **Scientia Medica**, v. 20, p. 131-143, 2010.

STÁBELI, R.G.; AMUI, S.F.; SANT'ANA, C.D.; PIRES, M.G.; NOMIZO, A.; MONTEIRO, M.C.; ROMÃO, P.R.; GUERRA-SÁ, R.; VIEIRA, C.A., GIGLIO, J.R., FONTES, M.R., SOARES, AM. *Bothrops moojeni* myotoxin-II, a Lys49-phospholipase A₂ homologue: an example of function versatility of snake venom proteins. **Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol**, v. 142, p. 371-81, 2006.

SANTOS-FILHO, N. A.; SILVEIRA, L. B.; OLIVEIRA, C. Z.; BERNARDES, C. P.; MENALDO, D. L.; FULY, A. L.; ARANTES, E. C.; SAMPAIO, S. V.; MAMEDE, C. C.; BELETTI, M. E.; OLIVEIRA, F.; SOARES, A. M. A new acidic myotoxic, anti-platelet and prostaglandin I₂ inductor phospholipase A₂ isolated from *Bothrops moojeni* snake venom. **Toxicon**. v. 52, p. 908-917, 2008

SCHALOSKE, R. H.; DENNIS, E. A. The phospholipase A₂ superfamily and its group numbering system. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1761, p. 1246–1259, 2006.

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. **Int J Parasitol**, v. 30, p. 1217-1258, 2000.

TENTER, A. M. *Toxoplasma gondii* in animals used for human consumption. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Brasil, v. 104, n.2, p. 364-369, 2009.

TIZARD, I.R. **Imunologia Veterinária Uma Introdução** Editora Roca. São Paulo: pp 312-362, 2002.

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*. **J Exp Med**, v. 189, p. 1083-1092, 1999.

YUAN, Z.; GAO, S.; LIU, Q.; XIA, X.; LIU, X.; LIU, B.; HU, R. *Toxoplasma gondii* antibodies in cancer patients. **Cancer Letters**, v. 254, p. 71–74, 2007

WATANABE, L.; SOARES, A.M.; WARD, R.J.; FONTES, M.R.M.; ARNI, R.K. Structural insights for fatty acid binding in a Lys49-phospholipase A₂: crystal structure of myotoxin II from *Bothrops moojeni* complexed with stearic acid, **Biochimie**, v. 87, p.161–167, 2005.

Ward, R.J.; Chioato, L.; de Oliveira, A.H.C.; Ruller, R.; Sá, J.M. Active-site mutagenesis of a Lys49-phospholipase A₂: biological and membrane-disrupting activities in the absence of catalysis, **Biochem. J.** v.362, p.89–96, 2002.

Capítulo 2:

Efeito antiparasitário sobre *Toxoplasma gondii* induzido pela BnSP-7, uma PLA₂-Lys49 homóloga da peçonha de *Bothrops pauloensis*

Resumo

A toxoplasmose afeta um terço da população mundial com alta incidência em áreas tropicais. Uma vez que esta doença tem grande relevância na saúde pública, a busca por novas abordagens terapêuticas são constantemente exigidas. Neste trabalho nós relatamos os efeitos antiparasitários da toxina BnSP-7, uma fosfolipase A₂ Lys49 homóloga da peçonha de *Bothrops pauloensis*, em *Toxoplasma gondii*. BnSP-7 apresentou citotoxicidade contra células HeLa em doses mais elevadas (200 µg/mL a 50 ug/ ml), enquanto que em doses mais baixas (25 ug/ml a 1,56 ug/ml), a toxina não interferiu na viabilidade da HeLa. A toxina não alterou a viabilidade de formas taquizotas de *T. gondii*, realizado pelo ensaio de exclusão de azul de tripan, mas diminuiu tanto a adesão quanto à proliferação desses parasitas, quando foram tratados antes da infecção. Também foi realizado a dosagem de citocinas a partir de sobrenadantes recolhidos a partir de células HeLa infectadas com formas taquizoítas de *T. gondii* previamente tratados com meio RPMI ou BnSP-7. A produção de MIF e IL-6 foram aumentadas pelas células HeLa após o tratamento com BnSP-7. Estes dados sugerem que a toxina BnSP-7 é uma ferramenta importante para a descoberta de novos alvos de parasitas que podem ser explorados para desenvolver novos fármacos para o tratamento da toxoplasmose.

Palavras-chave: *Bothrops pauloensis*; Fosfolipase A₂, peçonha de serpente, *Toxoplasma gondii*

Anti-parasitic effect on *Toxoplasma gondii* induced by BnSp-7, Lys49-phospholipase A₂ homologue from *Bothrops pauloensis* venom

Isabela Pacheco Borges^{a**}, Letícia Eulálio Castanheira^{a,d**}, Bellisa Freitas Barbosa^b, Dayane Lorena Naves de Souza^a, Rafaela José da Silva^b, José Roberto Mineo^c, Kelly Aparecida Yoneyama Tudini^a, Renata Santos Rodrigues^a, Eloísa Amália Vieira Ferro^b, Veridiana de Melo Rodrigues^{a,d*}

^aLaboratório de Bioquímica e Toxinas Animais, Instituto de Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia, UFU, Uberlândia-MG, Brazil;

^bLaboratório de Imunofisiologia da Reprodução, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Uberlândia, UFU, Uberlândia-MG, Brazil;

^cLaboratório de Immunoparasitologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Uberlândia, UFU, Uberlândia-MG, Brazil; ^dINCT, Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Nano-Biofarmacêutica, Brazil.

*Corresponding author: veridiana@ingeb.ufu.br

E-mail: Phone: +55 34-3225-8436 r 22 Fax: +55 34-3225-8436 r 24.

Laboratory address: Pará Avenue, 1720. CEP: 38400-902. Uberlândia-MG, Brazil.

** These authors contributed equally for this manuscript.

Abstract

Toxoplasmosis affects a third of world population with high incidence in tropical areas. Since this disease has great relevance in health public, the search for new therapeutic approaches has been considered. Here, we report the antiparasitic effects of BnSP-7 toxin, a Lys49 phospholipase A₂ homologue from *Bothrops pauloensis* snake venom, on *Toxoplasma gondii*. BnSP-7 presented activity against HeLa host cells in higher doses (200 µg/mL to 50 µg/mL) by MTT assay, whereas in lower doses (25 µg/mL to 1.56 µg/mL) does not interfere with HeLa viability. Also, the toxin did not presented effects on *T. gondii* tachyzoite viability as carried out by trypan blue exclusion, but decreased both adhesion and parasite proliferation, when tachyzoites were treated before infection. We also performed cytokine measurements from supernatants collected from HeLa cells infected with *T. gondii* tachyzoites previously treated with RPMI or BnSP-7. MIF and IL-6 productions by HeLa cells were increased by BnSP-7 treatment. These data suggest that the BnSP-7 toxin is an important tool for the discovery of new parasite targets that can be exploited to develop new drugs for toxoplasmosis treatment.

Keywords: *Bothrops pauloensis*; Phospholipase A₂, Snake venom, *Toxoplasma gondii*

2.0 - Introduction

Toxoplasma gondii is an intracellular protozoan parasite from Apicomplexa phylum ubiquitously distributed in nature. This parasite provoked a disease named Toxoplasmosis, and it occurs worldwide and affects a third of the world population (Montoya and Liesenfeld, 2004). Its incidence is higher in tropical areas and decreases with increasing latitude (Petersen, 2007). Especially in Brazil, the incidence of congenital toxoplasmosis is higher than in other parts of the world, since several types of atypical strains are found promoting severe symptoms in the children infected congenitally (Gilbert *et al.* 2008; Dubey *et al.* 2012). *T. gondii* has developed mechanisms that make possible a long-lasting parasite-host interaction to assure its survival without inducing life-threatening disease in the intermediate host, making it extremely adapted for infection in humans (Lang and Lüder, 2007).

In addition, the standard treatment of toxoplasmosis is limited and provokes serious side effects and toxicity to the host (Montoya and Liesenfeld, 2004; Carruthers, 2006; Martins-Duarte *et al.* 2006; Petersen, 2007); thus, alternative therapeutic compounds are needed. Many studies proposed alternative strategies for the treatment of toxoplasmosis, including extract plants (Oliveira *et al.* 2009), azithromycin (Costa *et al.* 2009), toltrazuril (KUL *et al.* 2013) and enrofloxacin (Barbosa *et al.* 2012).

Our previous study demonstrated the potential anti-parasitic effect of BpLec, a C-type lectin isolated from *Bothrops pauloensis* snake venom, since this lectin reduced the *T. gondii* infection in human epithelial uterine cells (HeLa lineage) (Castanheira *et al.* 2015). In this sense, animal venoms, especially snake venoms, have been the subject of several studies that demonstrate their therapeutic potential (Costa *et al.* 2008; Passero *et al.* 2008; Nunes *et al.* 2013; Castanheira *et al.* 2015; Rodrigues *et al.* 2015). Different proteins present in snake venoms have showed anti-parasitic effects, among these highlighted phospholipases A₂ (PLA₂) (Guillaume *et al.* 2004; Stábeli *et al.* 2006; Torres *et al.* 2010; Adade *et al.* 2010; Costa Torres *et al.* 2010; Castillo *et al.* 2012; Nunes *et al.* 2013; de Moura *et al.* 2014).

PLA₂ consist of 120–125 amino acid residues able to hydrolyze the 2-acyl ester bond of phospholipids releasing fatty acids and lysophosphatides (Arni and

Ward, 1996; Kini, 2003). A subgroup of these PLA₂ has been shown to be devoid of enzymatic activity due to critical amino acid substitutions, including the replacement of Asp49 by a lysine, and therefore these variants have been referred to as Lys49 PLA₂ homologues (Lomonte *et al.* 2003). However, these Lys49-PLA₂s are capable of disrupting the integrity of membranes and provoke many pharmacological effects (Díaz *et al.* 1991; Rufini *et al.* 1992; Lomonte *et al.*, 2003; Lomonte *et al.* 2012).

BnSP-7, a Lys49 PLA₂ homologue, is the most well studied toxin from *B. pauloensis* venom (Rodrigues *et al.* 1998; Soares *et al.* 2000; Magro *et al.* 2003; Oliveira *et al.* 2009; Nunes *et al.* 2013). Recently, Nunes *et al.* (2013) reported the inhibition of *L. (L.) amazonensis* promastigotes growth by BnSP-7, as well as delaying in amastigotes-promastigote differentiation, ultrastructural changes in promastigotes morphology and reduction in infectivity index. Considering this high pharmacological potential of BnSP-7 as a structural model for drug design for protozoan disorders treatment, here we describe the BnSP-7 effects on *T. gondii* tachyzoites adhesion and proliferation. In addition, we demonstrated the profile of cytokines induced by BnSP-7 involved in parasitism control in toxoplasmosis.

3.0 - Material and methods

3.1- BnSP-7 purification

BnSP-7 toxin was isolated from *B. pauloensis* snake venom according to Rodrigues *et al.* (1998) and Soares *et al.* (2000) with minor modifications. Briefly, approximately 200 mg of *B. pauloensis* was resuspended in 2 mL of 50 mM ammonium bicarbonate NH₄HCO₃ buffer (pH 7.8) and centrifuged at 3000 g for 10 min at 4 °C. The supernatant was recovered and injected on a CM-Sepharose Fast Flow resin previously equilibrated and initially eluted with the same buffer at room temperature. Fractions were collected at 1 ml/tube 6,5mL/h (flow rate by a collector Redifrac fraction (Amersham Biosciences of Brazil Ltda). Fractions containing PLA₂ (BnSP-7) were monitored by Ultrospec 1000 spectrophotometer - Amersham Pharmacia Biotech by absorbance at 280nm. This fraction was lyophilized and stored at -20°C and after it was rechromatographed by reverse-

phase chromatography (RP-HPLC) C18 column (GE healthcare). The column was equilibrated with solvent A (0.1% trifluoroacetic acid, 4% acetonitrile) and eluted with a concentration gradient of solvent B (0.1% trifluoroacetic acid, 80% acetonitrile) from 0% to 100%, and a flow rate of 0.5 ml / min for 33 min. The single peak ABS 280 nm was lyophilized and stored at -20° C and later was submitted on 12.5% SDS PAGE (v/v) according to Laemmli (1970) for homogeneity analysis. This protein was assessed further on *T. gondii* parasitism as described below.

3.2 - Cell culture

HeLa cell line (human epithelial uterine cells) was obtained from American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA). These cells were cultured in 75 cm² flasks with RPMI-1640 medium (GIBCO, Paisley, UK), supplemented with 23 mM sodium carbonate, 25 mM HEPES, 100 µg/ml streptomycin, 100 U/ml penicillin (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA) and 10% heat-inactivated fetal calf serum (complete medium) (Cultilab, Campinas, SP, Brazil) in a humidified incubator at 37 °C and 5% CO₂ (Barbosa *et al.* 2008).

3.3 – Parasites

T. gondii tachyzoites (2F1 clone), which are derived from the RH strain, highly virulent, and express constitutively cytoplasmic β-galactosidase, were gift from Dr. Vern Carruthers, Medicine School of Michigan University (USA). These parasites were maintained in HeLa cells cultured in RPMI 1640 medium supplemented with penicillin, streptomycin and 2% FBS at 37° C and 5% CO₂.

3.4 - Cellular viability in HeLa cells

The cellular viability in the presence of BnSP-7 toxin was performed on HeLa by a colorimetric assay, based on mitochondrial oxidation of the MTT reagent (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide; thiazolyl

blue tetrazole) (Sigma), as previously described by Mosmann (1983) with some modifications. Briefly, HeLa cells were cultured in 96-well plates (3×10^4 cells/200 μ L/well) in complete medium for 24 h at 37°C and 5% CO₂. Next, cells were treated with different concentrations of BnSP-7 (200 μ g/mL to 1.5625 μ g/mL) in serial twofold dilutions. After 24 h, the supernatants were discarded and 10 μ L of MTT and 90 μ L of medium 10% FBS were added to each well during 3 h, at the same conditions of culture. Afterward, formazan crystals were solubilized in 10% sodium dodecyl sulfate (SDS) (Sigma) and 50% N, N- dimethyl formamide. The optical density was determinate at 570 nm in a plate reader (Titertek Multiskan Plus, Flow Laboratories, Mc Lean, USA). The results were expressed as percentage of viable cells in relation to controls (100% of the viability). This assay was performed in triplicate.

3.5 - Tachyzoite viability

Tachyzoites (4×10^6 / mL) were treated with BnSP-7 (50 μ g/mL, 25 μ g/mL and 12.5 μ g/mL) during 30 minutes and dyed by trypan blue. The control of the assay was tachyzoites treated with RPMI-1640 medium. Viable cells that present a clear cytoplasm were counted in an optical microscope (Strober, 2001; Castanheira *et al.* 2015). This assay was performed in triplicate.

3.6 - Adhesion Assay

To perform this assay, we choose two treatment approaches. In a first step of experiments, HeLa cells were treated incubated with BnSP-7 (3.0 μ g/mL and 1.5 μ g/mL) during 1 or 24 h, and after this time, the cells were infected with untreated parasites. In a second step, only tachyzoites were treated with BnSP-7 (50 μ g/mL, 25 μ g/mL and 12.5 μ g/mL) during 30 minutes for posterior infection in HeLa cells. As a control, tachyzoites or HeLa cells were treated with only RPMI medium.

Briefly, according to Oliveira *et al.* (2006), HeLa cells (2×10^4 cells/200 μ L/well), previously treated or not with BnSP-7, were cultured in a 24-well plate containing 13 mm cover slips in each well. After 24 h, cells were fixed with 4% paraformaldehyde in phosphate buffered saline (PBS) during 30 minutes

and, after washing in PBS for removing this solution, untreated or treated *T. gondii* tachyzoites (1×10^5 cells/mL) were added to each well. After three hours of interaction, the cells were again fixed overnight. Finally, the cover slips were stained with toluidine blue by 3 seconds. The cover slips were analyzed in light microscope in order to verify the following parameters: the number of cells with adhered parasites and the total number of parasites adhered to these cells in a total of 200 cells examined randomly. Each assay was implemented using one of these treatments exclusively. Three independent experiments were performed in triplicate for each treatment approach.

3.7 - Intracellular Proliferation Assay

HeLa cells were cultured on a 96-well culture plate (2×10^4 cells/200 μ L/well) in RPMI medium with 10% FBS for 24h at 37 °C and 5% CO₂. After, the supernatant was discarded and RPMI (control) or *T. gondii* tachyzoites treated with BnSP-7 (50 μ g/mL, 25 μ g/mL and 12.5 μ g/mL), 1.5×10^5 parasites/200 μ L/well, were added and incubated for 24 h. Supernatants were collected and maintained in the freezer at -80 °C for posterior cytokine measurement. The cells were submitted to *T. gondii* intracellular proliferation using a colorimetric β -galactosidase assay as previously described by Teo *et al.* (2007). Briefly, HeLa cells were incubated with 100 μ L of lysis buffer (100 mM HEPES, 1mM MgSO₄, 0.1% Triton X-100, 5 mM dithiothreitol) during 15 minutes. Afterward, the lysates were mixed with 160 μ L of assay buffer (100 mM phosphate buffer pH 7.3, 102 mM β -mercaptoethanol, 9 mM MgCl₂) and, subsequently, with 40 μ L of 6.25 mM CPRG (chlorophenol red- β - D-galactopyranoside; Roche, Indianapolis, IN, USA). The β -galactosidase activity was measured at 570 nm using a microplates reader (Titertek Multiskan Plus, Flow Laboratories) and the data were shown as the number of tachyzoites determined by Microplate Manager Software (Bio-Rad, Hercules, CA, USA), using a standard curve with known tachyzoite concentrations (1×10^6 to 15.625×10^3).

3.8 - Cytokine measurement

The interleukin (IL)-6, macrophage migration inhibitory factor (MIF) and tumoral necrose factor (TNF)- α cytokines were measured in the culture supernatants of HeLa cells from proliferation assay, as described above. The dosage of the cytokines was measured by ELISA according to the manufacturer's instructions (BD Biosciences, San Jose, California, USA). The limit of detection was 4.7 pg/ml for IL-6 and 62.5 pg/mL for MIF and and 125 ng/mL for TGF- β 1.

3.9 - Statistical analysis

All data were evaluated as mean \pm standard error of the mean from three independent experiments performed in triplicate. Differences between treatments and controls were analyzed by ANOVA with multiple comparisons by Bonferroni, using GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc., San Diego, USA). Statistical significance was established when $P < 0.05$.

4.0 - Results

4.1 - BnSP-7 alters the viability in HeLa cells, but not in *T. gondii* tachyzoites

BnSP-7 Lys-PLA₂ was shown to be homogeneous by SDS-PAGE after chromatographic isolation (results not shown). This toxin was assayed on *T. gondii* parasitism as described as follows. The HeLa cells were treated with different concentrations of BnSP-7 in order to select subtoxic concentrations for parasite adhesion inhibition tests. When we verified the cellular viability in HeLa cells, BnSP-7 decreased this viability in all the concentration tested, with significant differences between the control (RPMI) and treatments with BnSP-7 ($P < 0.05$, Fig. 1A). This toxin reduced 50 and 30% of viability on HeLa cells at 200-50 μ g/mL (Fig. 1A). Then, the concentrations of 3.0 μ g/mL and 1.5 μ g/mL were selected for adhesion experiments.

We also tested the BnSP-7 effects on *T. gondii* tachyzoites viability. The concentrations used in this pre-treatment were determined according to Nunes *et al.* (2013), considering the lower doses that were capable of altering the *L. (L.)*

amazonensis functions and morphology. Those doses of 50 µg/mL, 25 µg/mL and 12.5 µg/mL were not cytotoxic to the tachyzoites, as established by trypan blue exclusion and they were chosen for further experiments (Fig. 1B).

4.2 - *T. gondii* tachyzoites previously treated with BnSP-7 reduce their adhesion in HeLa cells

For analyzing BnSP-7 effects on parasitism, two approaches were evaluated: the first by treating the host cells (HeLa) with BnSP-7 and the second by treat the tachyzoite with BnSP-7 before adhesion/infection. When HeLa cells were treated with BnSP-7 at 3.0 µg/mL and 1.5 µg/mL, doses that were not cytotoxic to these cells, no action was noted for reducing the number of cells with adhered parasites (Fig. 2A) as well as the total number of parasites adhered to these cells (Fig. 2B) after 1 and 24 h in comparison to untreated cells.

On the other hand, when tachyzoites were treated 30 minutes before interaction with HeLa cells, the adhesion of these parasites was significantly reduced when compared to untreated parasites (Fig. 3A and 3B). The comparison between the two treatments conditions suggested that the most effective for inhibit the adhesion of the parasites to the host cell was the previous treatment of parasites with BnSP-7-PLA₂.

4.3 - *T. gondii* tachyzoites previously treated with BnSP-7 reduce their intracellular proliferation in HeLa cells

As the anti-parasitic effects responded better to treatment of the parasite before infection, we performed the intracellular proliferation assay only using this approach. As result, it was observed that BnSP-7 was also able to decrease the intracellular proliferation parasite if compared to untreated parasites as assessed by β-galactosidase measurement, and this effect was in a dose-dependent manner (Fig. 4).

4.4 - BnSP-7 increases the IL-6 and MIF release

In the present work, we also carried out tests to determine the profile of cytokines involved in the parasite proliferation in HeLa cells. Supernatants collected from HeLa culture previously infected with BnSP-7-treated tachyzoites were used for the quantification of IL-6, TNF- α and MIF cytokines.

The concentration of TNF- α in the collected supernatants was below the detection limit (data not shown). IL-6 secretion by HeLa cells was increased in infected cells with untreated parasites in comparison to uninfected cells ($P < 0.05$, Fig. 5A). Also, when the parasites were pretreated with BnSP-7, regardless of the concentration, the IL-6 production was upregulated when compared to untreated parasites or uninfected cells ($P < 0.05$, Fig. 5A).

Finally, the secretion of MIF by HeLa cells was increased when the cells were infected by untreated tachyzoites in relation to uninfected cells ($P < 0.05$, Fig. 5B). Also, the previous treatment of tachyzoites with BnSP-7, regardless of the concentration, induced increased MIF release in comparison to untreated parasites or uninfected cells ($p < 0.05$, Fig. 5B).

5.0 – Discussion

Several studies have described the PLA₂ ability derived from snake venom to inhibit the growth of bacteria, fungi and parasites such as *Leishmania spp*, *Giardia duodenalis*, *Trypanosoma cruzi* and *Plasmodium falciparum* (Deregnaucourt and Schrevel, 2000; Guillaume *et al.* 2004; Nunez *et al.* 2004; Santamaría *et al.* 2005; Shinohara *et al.* 2006; Passero *et al.* 2008; Adade *et al.* 2010; Costa Torres *et al.* 2010; Nunes *et al.* 2013), showing that PLA₂s venom represent a valuable source of molecules with antiparasitic activity. However, only two studies demonstrated the effects of snake venom toxins in *T. gondii* infection (Bastos *et al.* 2008; Castanheira *et al.* 2015). These studies encouraged us to evaluate the effects of a Lys49 phospholipase A₂ isolated from *B. pauloensis* snake venom in the adhesion and proliferation of *T. gondii*.

BnSP-7 was cytotoxic to HeLa cells when assayed only at higher doses and was not able to cause cytotoxicity on tachyzoites at 50 $\mu\text{g/mL}$, 25 $\mu\text{g/mL}$ and

12.5µg/ mL. Nunes *et al.* (2013) demonstrated a high cytotoxicity induced by BnSP-7 in *Leishmania (Leishmania) amazonensis* inhibiting parasite proliferation 60–70% at concentrations of 50–200 µg mL of toxin 96 h after treatment. In the same way, Stábili *et al.* (2006) demonstrated that MjTx II-, a PLA₂ Lys-49 isolated from the venom of *B. moojeni*, was able to reduce approximately 50% of the population of *Leishmania sp.* (*L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) braziliensis*, *L. (L.) major* and *L. (L.) donovani*). Although some works have showed that PLA₂s exert cytotoxic effect on parasites (Stábili *et al.* 2006; Nunes *et al.* 2013; de Moura *et al.* 2014), BnSP-7 seems to be non-toxic for *T. gondii* tachyzoites in the doses used in our present study.

Pre-treatment of *T. gondii* tachyzoites with BnSP-7 induced a significant reduction in the adhesion of these parasites to HeLa cells. The parasite invasion process involves the interaction of the parasite with the host cell membrane (Pollard *et al.* 2008; Blader and Saeij, 2009). Thus, we speculated that BnSP-7 has a potential effect in this process by causing interference in the parasitic membrane, thereby decreasing the adhesion and consequently the invasion of the parasite in the host cell. In this sense, Nunes *et al.* (2013) showed that *Leishmania* promastigotes treated with 200 µg /mL BnSP-7 showed a change in the profile of the parasite protein, suggesting that the toxin may be causing effects on components of the plasma membrane of the parasite, which would result in interference infectivity. Also, Castillo *et al.* (2012) observed changes in the intraerythrocytic development of *Plasmodium* after treated with two PLA₂s from *Bothrops asper* venom, indicating that structural changes occur, as well as modifications in membrane functions in parasitized red blood cells. These results indicate that the PLA₂s action in parasites cause great interference in their cell membranes causing structural changes as well as extravasations of protein content. We suggest that BnSP-7 is also capable of causing changes in components of the cell membrane of *T. gondii*, thus resulting in decreased of adhesion in HeLa cells.

After to verify the significant reduction in the adhesion of *T. gondii* in HeLa cells using tachyzoites pretreated with BnSP-7, we also investigated the *T. gondii* intracellular proliferation when the tachyzoites were pretreated with this toxin. We could observe again a significant reduction in the parasite proliferation. Thus, it is possible to conclude that BnSP-7 changes the adhesion and intracellular

proliferation of *T. gondii* in HeLa cells. During parasite invasion, the plasma membrane is stretched to form the parasitophorous vacuole (PV) (Sibley *et al.* 2007). Once infection is established in the host cell, *T. gondii* starts a dividing process called endodiogenia in which two daughter cells are formed inside a parent cell, which degenerate the end of the process (Sheffield and Melton, 1968). When the tachyzoite is pretreated with BnSP-7 before infecting the host cell, the permeability and fluidity of its plasma membrane can be changed, which might affect the functional activity of the vacuole as much as the formation of the membrane of the daughter cells, therefore reducing its intracellular proliferation, as we observed in our results. Future studies are necessary to verify the real mechanisms triggered by BnSP-7 in *T. gondii* tachyzoites that may explain the phenomena observed in this present study.

Our findings about influence of BnSP-7 on *T. gondii* infection are in agreement with other studies. Castillo *et al.* (2012) showed the antiplasmodial effect of *Bothrops asper* whole venom and two fractions, one containing catalytically-active phospholipases A₂ (PLA₂) (fraction V) and another containing a PLA₂ homologue devoid of enzymatic activity (fraction VI). Both venom and fractions V and VI exhibited antiplasmodial activity on the FCB1 strain of *P. falciparum*, with fraction V being more active than fraction VI. However, a PLA₂ homologue devoid of enzymatic activity also resulted in restriction of *P. falciparum* multiplication, confirming a catalytically-independent antiplasmodial activity. The authors attributed this effect to plasma membrane perturbing action caused by PLA₂s homologue, which results in an increase in permeability (Castilho *et al.*, 2012; Lomonte and Rangel, 2012).

It has been proposed that basic Lys-49 PLA₂s promote a disturbance in the cellular parasite membranes (de Moura *et al.* 2014) and it has been shown that the C-terminal region of these PLA₂ homologues is responsible for this catalytically-independent membrane perturbation, as demonstrated in bacteria (Nuñez *et al.* 2004; Barbosa *et al.* 2005; Santamaria *et al.* 2005; Gebrim *et al.* 2009; Lomonte *et al.*, 2010; Castilho *et al.*, 2012), constituting therefore a different mechanism from the one described for other PLA₂s (Deregnaucourt and Schrevel, 2000; Guillaume *et al.*, 2004).

A comprehensive mechanism for Lys49 PLA₂s was proposed, in a review of Fernandes *et al.* (2014); in which they have integrated all previous data and

identify critical residues involved in cytotoxicity (Fernandes *et al.* 2013). The authors reported the presence of two conserved regions on most Lys 49 PLA₂s: the “cationic membrane-docking site” (MDoS), formed by the strictly conserved C-terminal residues (Lys115 and Arg118), eventually aided by other cationic and exposed residues such as Lys20, Lys80, Lys122 and Lys127; and the “hydrophobic membrane-disruption site” (MDiS) formed by residues of Leu and Phe. This mechanism involves an allosteric transition and the participation of two independent interaction sites with the target membrane and includes the binding of a fatty acid at the hydrophobic channel, which leads to allosteric transition and structure stabilization, exposing MDoS and MDiS to the membranes. The presence of those entire sites is described to BnSP-7 which leads us to suggest that this is one way of how the toxin can act in *Toxoplasma* membrane (Fernandes *et al.* 2014). However, the exact mechanism of action of this protein specifically on *T. gondii* is still currently obscure. Additional detailed studies must be conducted to better understand the biological and molecular effects of BnSP-7 toxin on *T. gondii*.

Additionally, we performed cytokine measurements from supernatants collected from HeLa cells infected with *T. gondii* tachyzoites previously treated with RPMI or BnSP-7. BnSP-7 elicits the increasing of the pro-inflammatory cytokines IL-6 and MIF. In toxoplasmosis, these cytokines are known to act in the disease control by the host cell. Several studies have reported that it is a normal feature the higher production of some pro-inflammatory cytokines such as IL-6, as a defense mechanism against intracellular parasitism (Jebbari *et al.* 1998). Barbosa *et al.* (2015) have shown an increased IL-6 production in human trophoblast cells (BeWo lineage) infected by *T. gondii*, representing a potential protector mechanism of these cells against *T. gondii* infection. Additionally, Castro *et al.* (2013) showed that the THP-1 (human monocytes) and BeWo cells infected with *T. gondii* increased the levels of MIF, IL-12 and IL-6, and decreased the production of anti-inflammatory cytokines, as TGF- β 1. Then, our data demonstrate that the pretreatment of parasites with BnSP-7 at different doses induced high IL-6 production, thereby stimulating a more effective immune response against the parasite. Similar results were observed in other studies demonstrating that IL-6 participates in the immune response protective against *Giardia duodenalis* (Kamda *et al.* 2012) and *Trypanosoma cruzi* (Gao and

Pereira, 2002), and plays a critical role in limiting microbial proliferation during early infection with *Listeria monocytogenes* (Dalrymple *et al.*, 1995), vaccinia virus (KOPF *et al.* 1994) and *Candida albicans* (Romani *et al.*, 1996).

BnSP-7 also induced higher secretion of MIF when compared with tachyzoites treated with RPMI. The role of MIF in parasitic infections seems complex. MIF is important for host defense against *Leishmania major* (Satoskar *et al.*, 2001), *Trypanosoma cruzi* (Reyes *et al.*, 2006), *Taenia crassiceps* (Rodriguez-Sosa *et al.* 2003) and *Schistosoma japonicum* (Stavitsky *et al.*, 2003), reinforcing the microbicidal activity of the innate response. This cytokine has been correlated with the parasite control in toxoplasmosis in various experimental models, including mice and in the maternal-fetal interface (Flores *et al.* 2008, Gomes *et al.* 2011, Franco *et al.* 2011; Barbosa *et al.* 2014), corroborating effects of BnSP-7 on tachyzoites shown here. *T. gondii* is able to increase the production of these cytokines by the host cell. However, the pretreatment of parasites with BnSP-7 enhances even more the cytokine production, thus this toxin show be an excellent tool in order to optimize the immune response of the host.

The cytotoxic activity of venoms and PLA₂s is a problem when using them in future biomedical applications. However, our results show that the PLA₂ isolated exerts an anti-Toxoplasma effect at a lower dose than that required to induce cytotoxicity in HeLa cells. The toxin could be investigated to act as an adjuvant in the treatment of toxoplasmosis by enhancing the natural immune response against the parasite. The current work might help to elucidate better the knowledge about the mechanisms involved in parasite-host interactions and represents an innovation in Toxinology, since little has been investigated about the contribution of snake venoms in this intriguing world-wide disease.

Acknowledgements:

The authors gratefully acknowledge the technical support of the Institute of Genetics and Biochemistry (INGEB/UFU) and the Institute of Biomedical Science (ICBIM/UFU) of the Federal University of Uberlandia.

Financial Support:

The authors gratefully thankful for the financial support of Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG).

References:

Adade, C.M., Cons, B.L., Melo, P.A., Souto-Padron, T. (2010). Effect of *Crotalus viridis viridis* snake venom on the ultrastructure and intracellular survival of *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology* **138**, 46–58.

Arni, R.K., Ward, R.J. (1996). Phospholipase A₂—a structural review. *Toxicon* **34**, 827–841.

Barbosa, P.S., Martins, A.M., Havt, A., Toyama, D.O., Evangelista, J.S., Ferreira, D.P., Joazeiro, P.P.; Beriam, L.O., Toyama, M.H., Fonteles, M.C. (2005). Renal and antibacterial effects induced by myotoxin I and II isolated from *Bothrops jararacussu* venom. *Toxicon* **46**, 376–386

Barbosa, B.F., Silva, D.A., Costa, I.N., Mineo, J.R., Ferro, E.V. (2008). BeWo trophoblast cell susceptibility to *Toxoplasma gondii* is increased by interferongamma, interleukin-10 and transforming growth factor-beta1. *Clin Exp Immunol* **151**, 536-545.

Barbosa, B. F., Gomes, A. O., Ferro, E. A .V., Napolitano, D. R., Mineo, J. R., Silva, N. M. (2012). Enrofloxacin is able to control *Toxoplasma gondii* infection in both *in vitro* and *in vivo* experimental models. *Vet. Parasitol* **187**, 44-52.

Barbosa, B. F., Paulesu, L., Ietta, F., Bechi, N., Romagnoli, R., Gomes, A. O., Favoreto-Junior, S., Silva, D. A. O.; Mineo, J. R., Mineo, T. W. P., Ferro, E. A. V. (2014). Susceptibility to *Toxoplasma gondii* proliferation in BeWo human trophoblast cells is dose-dependent of macrophage migration inhibitory factor

(MIF), via ERK1/2 phosphorylation and prostaglandin E₂ production. *Placenta* **35**, 152-162.

Barbosa, B. F., Lopes-Maria, J. B., Gomes, A.O., Angeloni, M.B., Castro, A.S., Franco, P.S., Fermino, M. L., Roque-Barreira, M.C., Ietta, F., Martins-Filho, O.A., Silva, D.A.O., Mineo, J.R., Ferro, E.A.V. (2015). IL-10, TGF Beta1, and IFN Gamma Modulate Intracellular Signaling Pathways and Cytokine Production to Control *Toxoplasma gondii* Infection in BeWo Trophoblast Cells. *Biology of reproduction* **92**, 1–13.

Bastos, L.M., Júnior, R.J., Silva, D.A., Mineo, J.R., Vieira, C.U., Teixeira, D.N., Homs-Brandeburgo, M.I., Rodrigues, V.M., Hamaguchi, A. (2008). *Toxoplasma gondii*: effects of neuwiedase, a metalloproteinase from *Bothrops neuwiedi* snake venom, on the invasion and replication of human fibroblasts *in vitro*. *Exp. Parasitol.* **120**, 391–396.

Blader, I. J., Saeij, J. P. (2009). Communication between *Toxoplasma gondii* and its host: impact on parasite growth, development, immune evasion, and virulence. *APMIS* **117**, 458-476.

Carruthers, V.B. (2006). Proteolysis and *Toxoplasma* invasion. *International Journal for Parasitology* **36**, 595–600.

Castanheira, L.E., de Souza, D.L.N., Silva, R.J., Barbosa, B., Mineo, J.R., Tudini, K.A., Rodrigues, R., Ferro, E.V., Rodrigues, V.M. (2015). Insights into anti-parasitism induced by a C-type lectin from *Bothrops pauloensis* venom on *Toxoplasma gondii*. *International Journal of Biological Macromolecules* **74**, 568–574

Castillo, J.C., Vargas, L.J., Segura, C., Gutiérrez, J.M., Pérez, J.C.A. (2012). *In Vitro* Antiplasmodial Activity of Phospholipases A₂ and a Phospholipase Homologue Isolated from the Venom of the Snake *Bothrops asper*. *Toxins* **4**, 1500-1516.

Castro, A.S., Alves, C.M., Angeloni, M.B., Gomes, A.O., Barbosa, B.F., Franco, P.S., Silva, D.A., Martins-Filho, O.A., Mineo, J.R., Mineo, T.W., Ferro, E.A. (2013). Trophoblast cells are able to regulate monocyte activity to control *Toxoplasma gondii* infection. *Placenta* **34**, 240–247.

Costa, F.L., Rodrigues R.S., Izidoro, L.F., Menaldo, D.L., Hamaguchi, A., Homsí-Brandeburgo, M.I., Fuly, A.L., Soares, S.G., Selistre-de-Araújo, H.S., Barraviera B, Soares A.M., Rodrigues, V.M. (2008). Biochemical and functional properties of a thrombin-like enzyme isolated from *Bothrops pauloensis* snake venom. *Toxicon* **54**, 725-735.

Costa, I. N., Angeloni, M. B., Santana, L. A., Barbosa, B. F., Silva, M. C., Rodrigues, A. A., Rostkowsa, C., Magalhães, P. M., Pena, J. D. O., Silva, D. A. O., Mineo, J. R., Ferro, E. A. V. (2009). Azithromycin inhibits vertical transmission of *Toxoplasma gondii* in *Calomys callosus* (Rodentia: Cricetidae). *Placenta* **30**, 884-890

Costa Torres, A.F., Dantas, R.T., Toyama, M.H., Diz Filho, E., Zara, F.J., Rodrigues de Queiroz, M.G., Pinto Nogueira, N.A., Rosa de Oliveira, M., de Oliveira Toyama, D., Monteiro, H.S., Martins, A.M. (2010). Antibacterial and antiparasitic effects of *Bothrops marajoensis* venom and its fractions: phospholipase A₂ and l-amino acid oxidase. *Toxicon* **55**, 795–804.

Dalrymple S.A, Lucian L.A, Slattery R, McNeil T, Aud D.M, Fuchino S. (1995). Interleukin-6-deficient mice are highly susceptible to *Listeria monocytogenes* infection: correlation with inefficient neutrophilia. *Infect Immun* **63**, 2262–2268

de Moura A.A, Kayano A.M, Oliveira G.A, Setúbal S.S, Ribeiro J.G, Barros N.B, Nicolete R, Moura L.A, Fuly AL, Nomizo A, da Silva SL, Fernandes CF, Zuliani JP, Stábeli R.G, Soares A.M, Calderon L.A. (2014). Purification and Biochemical Characterization of Three Myotoxins from *Bothrops matogrossensis* Snake Venom with Toxicity against *Leishmania* and Tumor Cells. *Biomed Res Int* **2014**, 1-13.

Deregnacourt, C., Schrevel, J. (2000). Bee venom phospholipase A₂ induces stage-specific growth arrest of the intraerythrocytic *Plasmodium falciparum* via modifications of human serum components. *J. Biol. Chem* **275**, 39973–39980.

Díaz, C., Gutiérrez, J.M., Lomonte, B., Gené, J.A. (1991). The effect of myotoxins isolated from Bothrops snake venoms on multilamellar liposomes: relationship to phospholipase A₂, anticoagulant and myotoxic activities. *Biochim. Biophys. Acta* **1070**, 455–460.

Dubey, J.P., Lago, E.G., Gennari, S.M., Su, J.L. Jones. (2012). Toxoplasmosis in humans and animals in Brazil: high prevalence, high burden of disease, and epidemiology, *Parasitology* **139**, 1375-1424.

Fernandes, C.A.H., E.J. Comparetti, R.J., Borges, S., Huancahuire-Vega, L.A., Ponce-Soto, S. Marangoni. (2013). Structural bases for a complete myotoxic mechanism: crystal structures of two non-catalytic phospholipases A₂-like from *Bothrops brazili* venom, *Biochim. Biophys. Acta* **1834**, 2772–2781.

Fernandes, C.A.H., Borges, R.J., Lomonte, B., Fontes, M.R.M. (2014). A structure-based proposal for a comprehensive myotoxic mechanism of phospholipase A₂-like proteins from viperid snake venoms. *Biochimica et Biophysica Acta* **1844**, 2265–2276

Flores, M., Saavedra, R., Bautista, R., Viedma, R., Tenório, E. P., Leng, L., Sánchez, Y., Juarez, I., Satoskar, A. A., Shenoy, A. S., Terrazas, L. I., Bucala, R., Barbi, J., Satoskar, A. R. Rodriguez-sosa, M. (2008). Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF) is critical for the host resistance against *Toxoplasma gondii*. *FASEB J.* **22**, 1-11.

Franco, P. S., Gomes, A. O., Barbosa, B. F., Angeloni, M. B., Silva, N. M., Teixeira-Carvalho, A., Martins-Filho, O. A., Silva, D. A. O., Mineo, J. R., Ferro, E. A. V. (2011). Azithromycin and spiramycin induce anti-inflammatory response in human trophoblastic (BeWo) cells infected by *Toxoplasma gondii* but are able to control infection. *Placenta* **32**, 838-844.

Gao W, Pereira MA. (2002). Interleukin-6 is required for parasite specific response

and host resistance to *Trypanosoma cruzi*. *Int J Parasitol*, **32**, 167-170.

Gebrim, L.C, Marcussi S, Menaldo D.L, de Menezes C.S, Nomizo A, Hamaguchi A, Silveira-Lacerda E.P, Homsí-Brandeburgo M.I, Sampaio S.V, Soares AM, Rodrigues V.M. (2009). Antitumor effects of snake venom chemically modified Lys49 phospholipase A₂-like BthTX-I and a synthetic peptide derived from its C-terminal region. *Biologicals*. **37**, 222-229.

Gilbert, R.E., K. Freeman, E.G. Lago, L.M. Bahia-Oliveira, H.K. Tan, M. Wallon, W. Buffolano, M.R. Stanford, E. Petersen. (2008). Ocular sequelae of congenital toxoplasmosis in Brazil compared with Europe, *PLoS Negl Trop Dis*. **2**, e277

Gomes, A. O., Silva, D. A. O., Silva, N.M., Barbosa, B.F., Franco, P.S., Angeloni, M.B., Fermino, M.L., Roque-Barreira, M.C., Paulesu, N.B.L.R., dos Santos, M.C., Mineo, J.R., Ferro, E.A.V. (2011). Effect of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in human placental explants infected with *Toxoplasma gondii* depends on gestational age. *The American Journal of Pathology* **178**, 2792–2801

Guillaume, C., Deregnaucourt, C., Clavey, V., Schrevel, J. (2004). Anti-*Plasmodium* properties of group IA, IB, IIA and III secreted phospholipases A₂ are serum-dependent. *Toxicon* **43**, 311–318.

Jebbari, H., Roberts, C.W., Ferguson, D.J.P., Bluethmann, H., Alexander, J. (1998). A protective role for IL-6 during early infection with *Toxoplasma gondii*. *Parasite Immunology* **20**, 231–239

Kamda J.D., Nash T.E., Singer S.M. (2012). *Giardia duodenalis*: dendritic cell defects in IL-6 deficient mice contribute to susceptibility to intestinal infection. *Exp Parasitol* **130**, 288-291

Kini, R. M. (2003). Excitement ahead: structure, function and mechanism of snake venom phospholipase A₂ enzymes. *Toxicon* **42**, 827-840.

Kopf, M., Baumann, H., Freer, G., Freudenberg, M., Lamers, M., Kishimoto, T. (1994). Impaired immune and acute-phase responses in Interleukin-6-deficiente mice. *Nature*, **368**, 339-342.

Kul, O., Yildiz, K., Ocal, N., Freyre, A., Deniz, A., Karahan, S., Atmaca, H. T., Gokpinar, S., Dincel, G. C., Uzunalioglu, T., Terzi, O. S. (2013). In vivo efficacy of toltrazuril on experimentally induced *Toxoplasma gondii* tissue cysts in lambs: a novel strategy for prevention of human exposure to meat-borne toxoplasmosis. *Res. Vet. Sci* **94**, 269-276

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

Lang C, Gross U, Lüder CG: (2007). Subversion of innate and adaptive immune responses by *Toxoplasma gondii*. *Parasitol Res* **100**, 191–203

Lomonte B, Angulo Y, Santamaría C. (2003). Comparative study of synthetic peptides corresponding to region 115-129 in Lys49 myotoxic phospholipases A₂ from snake venoms. *Toxicon* **42**, 307-312.

Lomonte B, Angulo Y, Moreno E. (2010). Synthetic peptides derived from the C-terminal region of Lys49 phospholipase A₂ homologues from viperidae snake venoms: biomimetic activities and potential applications. *Curr Pharm Des.* **16**, 3224-3230.

Lomonte, B., Rangel, J. (2012). Snake venom Lys49 myotoxins: From phospholipases A₂ to non-enzymatic membrane disruptors. *Toxicon* **60**, 520–530.

Magro, A. J., Soares, A.M., Giglio, J.R., Fontes, M.R.M. (2003). Crystal structures of BnSP-7 and BnSP-6, two Lys49-phospholipases A₂: quaternary structure and inhibition mechanism insights. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **311**, 713–720.

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.

Montoya, J.G., Liesenfeld, O. (2004). Toxoplasmosis. *The Lancet* **363**, 1965–1976.

Mosmann, T.J. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* **65**, 55–63.

Nunes, D.C., Figueira, M.M., Lopes, D.S., De Souza, D.L., Izidoro, L.F., Ferro, E.A., Souza, M.A., Rodrigues, R.S., Rodrigues, V.M., Yoneyama, K.A. (2013). BnSP-7 toxin, a basic phospholipase A₂ from *Bothrops pauloensis* snake venom, interferes with proliferation, ultrastructure and infectivity of *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. *Parasitology* **140**, 844-54.

Núñez, V., Arce, V., Gutierrez, J.M., Lomonte, B. (2004). Structural and functional characterization of myotoxin I, a Lys49 phospholipase A₂ homologue from the venom of the snake *Bothrops atrox*. *Toxicon* **44**, 91–101.

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**, 691–698.

Oliveira, T. C., Silva, D. A. O., Rostkowska, C., Béla, S. R.; Ferro, E. A. V., Magalhães, P. M., Mineo, J. R. (2009). *Toxoplasma gondii*: effects of *Artemisia*

annua L. on susceptibility to infection in experimental models *in vitro* and *in vivo*. *Exp. Parasitol*, **122**, 233-241

Passero, L. F. D., Laurenti, M. D., Tomokane, T. Y., Corbett, C. E. P. and Toyama, M.H. (2008). The effect of phospholipase A₂ from *Crotalus durissus collilineatus* on *Leishmania (Leishmania) amazonensis* infection. *Parasitology Research* **102**, 1025–1033.

Petersen, E. (2007). Toxoplasmosis. *Seminars in Fetal and Neonatal Medicine* **12**, 214–223.

Pollard, A. M., Onatolu, K. N., Hiller, L., Haldar, K., Knoll, L. J. (2008). Highly polymorphic family of glycosylphosphatidylinositol-anchored surface antigens with evidence of developmental regulation in *Toxoplasma gondii*. *Infect. Immun* **76**, 103-110.

Reyes, J.L., Terrazas, L.I., Espinoza, B., Cruz-Robles, D., Soto, V., Rivera-Montoya, I., Gómez-García, L., Snider, H., Satoskar, A.R., Rodríguez-Sosa, M. (2006). Macrophage migration inhibitory factor contributes to host defense against acute *Trypanosoma cruzi* infection *Infect Immun. United States* **74**, 3170-3179.

Rodrigues V.M., Soares A.M, Mancin A.C., Fontes M.R., Honsi-Brandeburgo M.I., Giglio J.R. (1998). Geographic variations in the composition of myotoxins from *Bothrops neuwiedi* snake venoms: biochemical characterization and biological activity. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*. **121**, 215-22.

Rodrigues, V. M., Lopes, D.S., Castanheira, L.E., Gimenes, S.N. C., de Souza, D.L. N., Achê, D.C., Borges, I.P., Yoneyama, K.A.G., Rodrigues, R.S. (2015). *Bothrops pauloensis* Snake Venom Toxins: The Search for New Therapeutic Models. *Current Topics in Medicinal Chemistry* **15**, 670-684

Rodríguez-Sosa, M., Rosas, L.E., David, J.R., Bojalil, R., Satoskar, A.R., Terrazas, L.I. (2003). Macrophage migration inhibitory factor plays a critical role in mediating protection against the helminth parasite *Taenia crassiceps*. *Infect Immun* **71**, 1247-1254

Romani, L., Mencacci, A., Cenci, E., Spaccapelo, R., Toniatti, C., Puccetti, P. (1996). Impaired neutrophil response and CD4⁺ T helper cell 1 development in interleukin 6-deficient mice infected with *Candida albicans*. *J Exp Med*; **183**:1345e55.

Rufini, S., Cesaroni, P., Desideri, R.F., Gubensek, F., Gutierrez, J.M., Luly, P., Maassoud, R., Morero, R., Pedersen, J.Z. (1992). Calcium ion independent membrane leakage induced by phospholipase-like myotoxins, *Biochemistry* **31**, 12424–12430

Santamaria, C., Larios, S., Quiros, S., Pizarro-Cerda, J., Gorvel, J.P., Lomonte, B., Moreno, E. (2005). Bactericidal and antiendotoxic properties of short cationic peptides derived from a snake venom Lys49 phospholipase A₂. *Antimicrob. Agents Chemother* **49**, 1340–1345.

Satoskar, A. R., Bozza, M., Rodriguez Sosa, M., Lin, G., and David, J. R. (2001). Migration-inhibitory factor gene-deficient mice are susceptible to cutaneous *Leishmania major* infection. *Infect. Immun.* **69**, 906–911

Sibley, L. D., Charron, A., Håkansson, S., Mordue, D., (2007). Invasion and Intracellular Survival by *Toxoplasma*. *Protozoans in Macrophages* 17-24

Sheffield, H.G., Melton, M.L. (1968). The fine structure and reproduction of *Toxoplasma gondii*. *J Parasitol* **54**, 209-226.

Shinohara, L., de Freitas, S.F., da Silva, R.J., Guimaraes, S. (2006). *In vitro* effects of *Crotalus durissus terrificus* and *Bothrops jararaca* venoms on *Giardia duodenalis* trophozoites. *Parasitology Research* **98**, 339–344.

Soares, A.M., Guerra-Sá R., Borja-Oliveira, C.R., Rodrigues, V.M., Rodrigues-Simioni L., Rodrigues, V., Fontes M.R., Lomonte, B., Gutiérrez, J.M., Giglio, J.R. (2000). Structural and functional characterization of BnSP-7, a Lys49 myotoxic phospholipase A₂ homologue from *Bothrops neuwiedi pauloensis* venom. *Arch Biochem Biophys.* **378**, 201-209.

Stábeli, R.G., Amui, S.F., Sant'Ana, C.D., Pires, M.G., Nomizo, A., Monteiro, M.C., Romão, P.R., Guerra-Sá, R., Vieira, C.A., Giglio, J.R., Fontes, M.R., Soares, AM. (2006). *Bothrops moojeni* myotoxin-II, a Lys49-phospholipase A₂ homologue: an example of function versatility of snake venom proteins. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* **142**, 371-81.

Stavitsky, A. B., Metz, C., Liu, S., Xianli, J., and Bucala, R. (2003). Blockade of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in *Schistosoma japonicum*-infected mice results in an increased adult worm burden and reduced fecundity. *Parasite Immunol.* **25**, 369–374

Strober, W (2001). Trypan blue exclusion test of cell viability. *Curr. Protoc. Immunol.* Appendix 3 (Appendix 3B).

Teo, C.F., Zhou, X.W., Bogyo, M., Carruthers, V.B. (2007). Cysteine protease inhibitors block *Toxoplasma gondii* microneme secretion and cell invasion. *Antimicrob. Agents Chemother* **51**, 679–688.

Torres, A. F. C., Dantas, R. T., Toyama, M. H., Filho, E. D., Zara, F. J., de Queiroz, M. G. R., Nogueira, N. A. P., de Oliveira, M. R., Toyama, D. O., Monteiro, H. S. A., Martins, A. M. C. (2010). Antibacterial and antiparasitic effects of *Bothrops marajoensis* venom and its fractions: phospholipase A₂ and L-amino acid oxidase. *Toxicon* **55**, 795–804.

Figures:

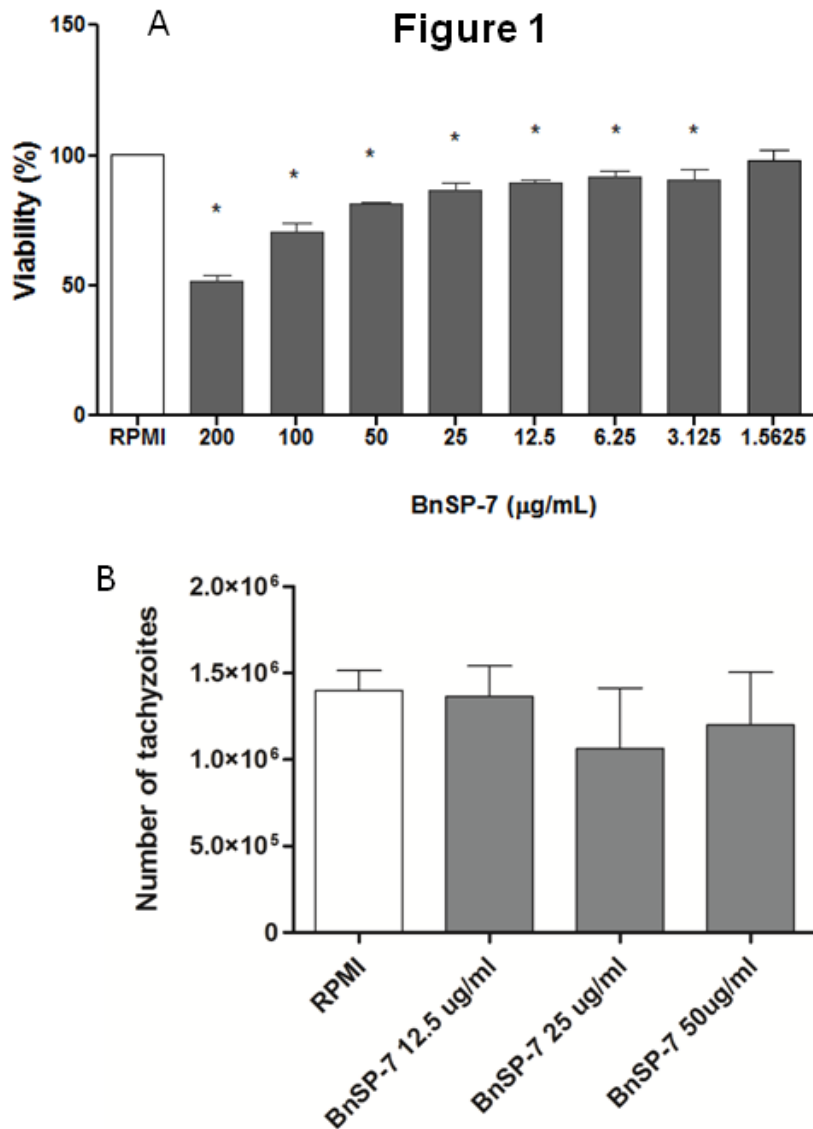


Fig. 1: Effects of BnSP-7 on HeLa and *T. gondii* tachyzoites viability. RPMI medium was used as a negative control for cell death. (A) HeLa viability assay with BnSP-7 treatments ranging from 200 to 1.5625 µg/mL (B) *T. gondii* tachyzoites viability with BnSP-7 treatments (50,0 µg/mL, 25 µg/mL and 12.5 µg/mL) (*) Significant differences between the negative control and treatments with RPMI and BnSP-7 (P<0.05; ANOVA)

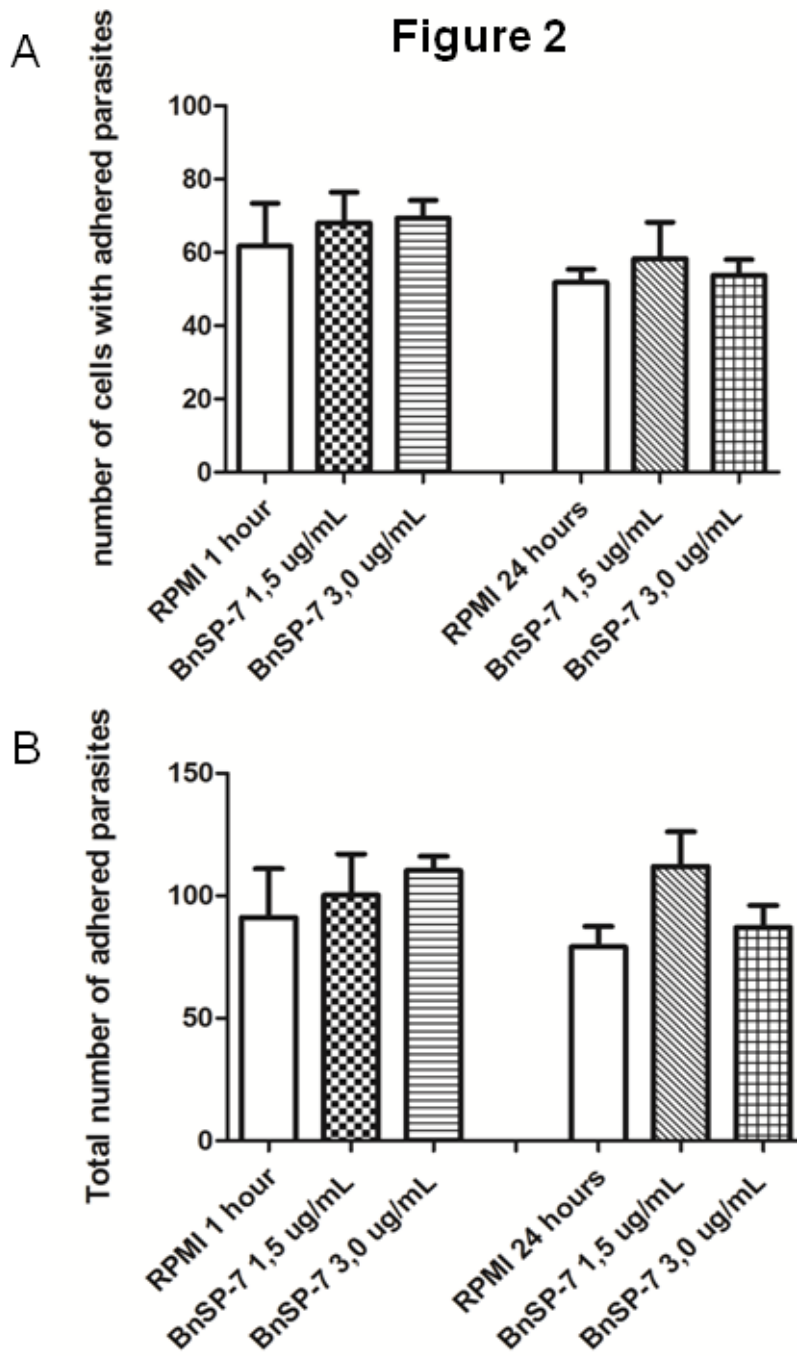


Fig. 2: Effects of BnSP-7 on *T. gondii* adhesion after treating host cells with BnSP-7 during 1 or 24 hours before parasite infection. Tachyzoites treated only with RPMI were considered as the control. This assay was evaluated in terms of number of HeLa cells with adhered parasites. (A) Total number of cells with adhered tachyzoites. (B) Total number of adhered parasites. (*) Significant differences between the negative control and treatments with RPMI and BnSP-7 ($P < 0.05$; ANOVA).

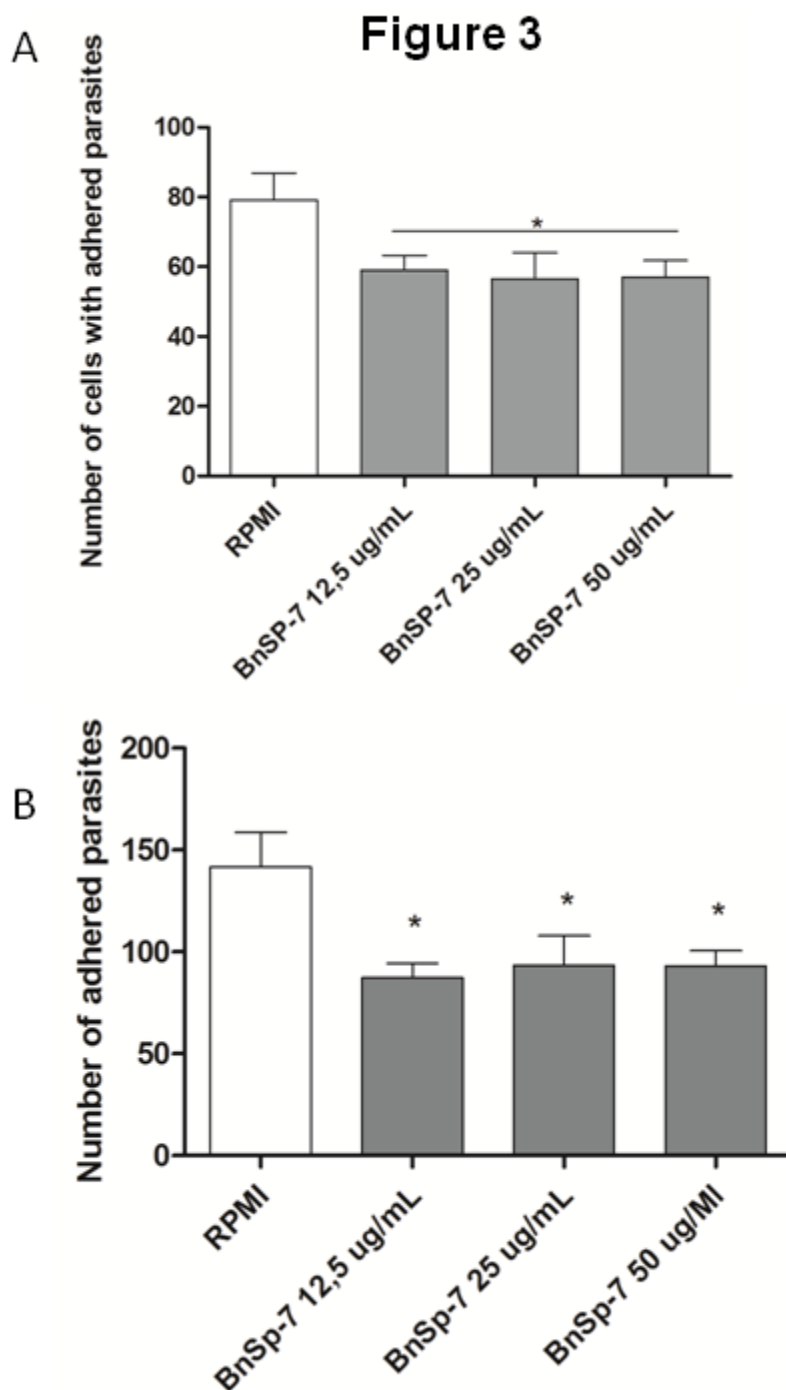


Fig. 3: Effects of BnSP-7 on *T. gondii* adhesion after treating *T. gondii* tachyzoites with BnSP-7 during 1 or 24 hours before parasite infection. Tachyzoites treated only with RPMI were considered as the control. This assay was evaluated in terms of number of HeLa cells with adhered parasites (A) Total number of cells with adhered tachyzoites. (B) Total number of adhered parasites. (*) Significant differences between the negative control and treatments with RPMI and BnSP-7 ($P < 0.05$; ANOVA)

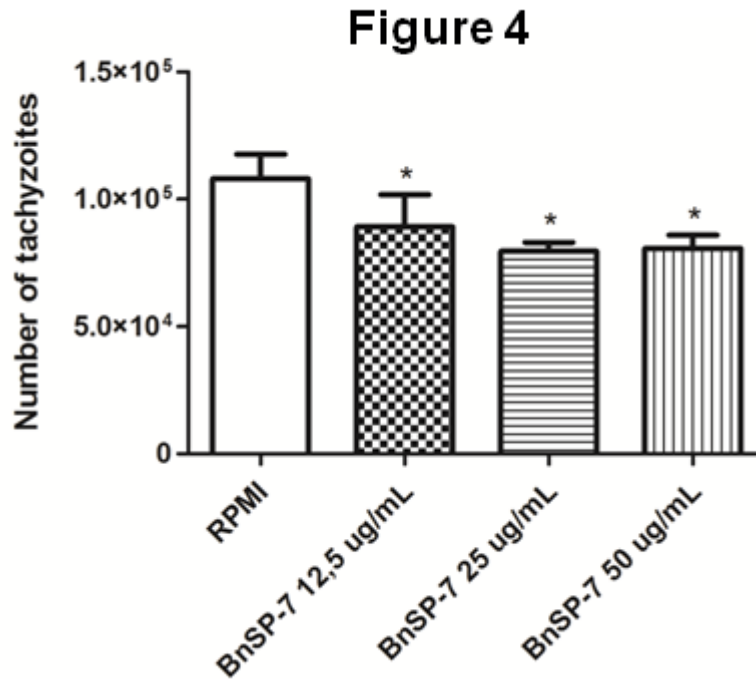


Fig. 4: Effects of BnSP-7 on *T. gondii* proliferation assay by β -galactosidase measurement 24 hours post-infection. Tachyzoites treated only with RPMI were considered as the control. (*) Significant differences between cells treated with RPMI or BnSP-7 ($P < 0,05$; ANOVA).

Figure 5

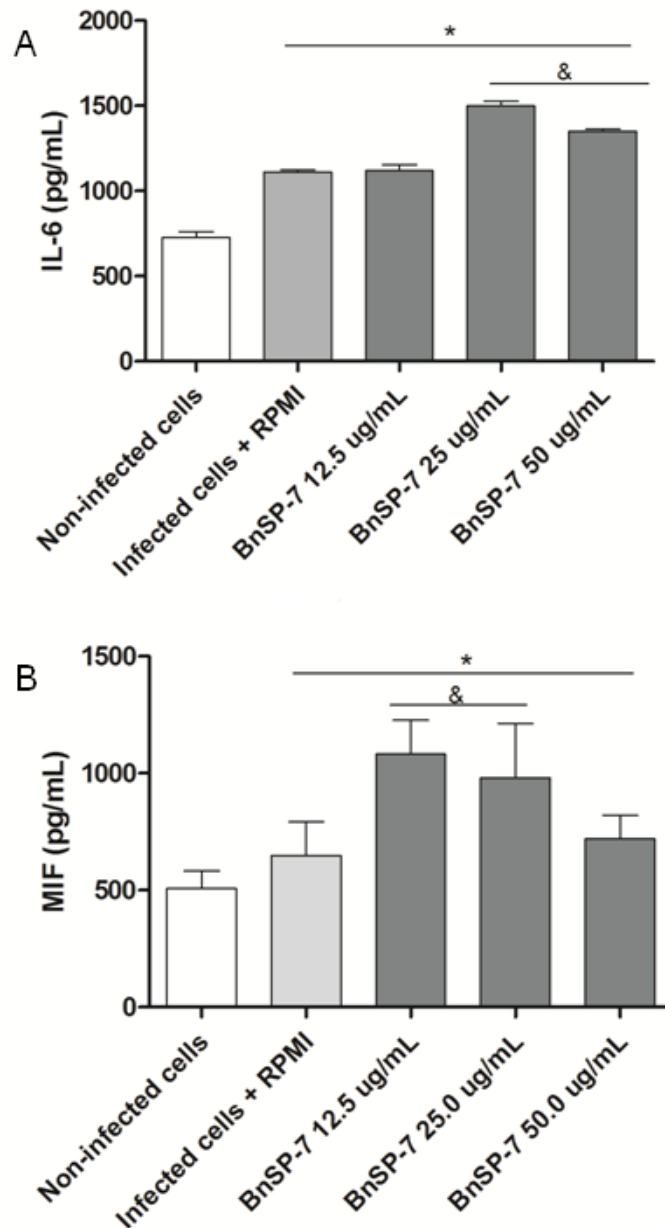


Fig. 5: Effects of BnSP-7 on cytokine measurements from supernatants collected from HeLa cells infected with *T. gondii* tachyzoites previously treated with RPMI or BnSP-7. The basal cytokine production from HeLa cells is designated as non-infected. Cytokine production by HeLa after infection of tachyzoites treated only with RPMI is designated as infected cells + RPMI (A) IL-6, (B) MIF productions were measured by ELISA (BD Biosciences, San Jose, California, USA). Significant differences between non-infected and infected cells (*) and between tachyzoites treated with RPMI or BnSP-7 (&) ($P < 0.05$; ANOVA).