

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**  
**CURSO DE BIOMEDICINA**

**FRANCIELE GONÇALVES PEREIRA LINO**

**AVALIAÇÃO FUNCIONAL DA METALOPROTEINASE BPMP-I ISOLADA DA  
PEÇONHA DE *BOTHROPS PAULOENSIS* NA INFECÇÃO EXPERIMENTAL POR  
*TOXOPLASMA GONDII***

Uberlândia, MG

2023

FRANCIELE GONÇALVES PEREIRA LINO

**AVALIAÇÃO FUNCIONAL DA METALOPROTEINASE BPMP-I ISOLADA DA  
PEÇONHA DE *BOTHROPS PAULOENSIS* NA INFECÇÃO EXPERIMENTAL POR  
*TOXOPLASMA GONDII***

Trabalho de conclusão de curso apresentado pela discente Franciele Gonçalves Pereira Lino como requisito para obtenção de Bacharel em Biomedicina, pelo curso de Biomedicina, na Universidade Federal de Uberlândia.

Uberlândia, MG

2023

FRANCIELE GONÇALVES PEREIRA LINO

**AVALIAÇÃO FUNCIONAL DA METALOPROTEINASE BPMP-I ISOLADA DA  
PEÇONHA DE *BOTHROPS PAULOENSIS* NA INFECÇÃO EXPERIMENTAL POR  
*TOXOPLASMA GONDII***

Trabalho de conclusão de curso apresentado pela discente Franciele Gonçalves Pereira Lino como requisito para obtenção de Bacharel em Biomedicina, pelo curso de Biomedicina, na Universidade Federal de Uberlândia.

Orientadora Prof. Dra. Veridiana de Melo Rodrigues  
Ávila

Coorientador Dr. Samuel Cota Teixeira

**Banca examinadora:**

Dr. Samuel Cota Teixeira (Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Uberlândia - UFU)

Dra. Bellisa de Freitas Barbosa (Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Uberlândia - UFU)

Dra. Cristiani Baldo da Rocha (Departamento de Bioquímica e Biotecnologia, Universidade Estadual de Londrina - UEL)

Uberlândia, MG

2023

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus por ter permitido eu chegar até aqui com saúde e fé, e apesar de todas as pedras no caminho, me ajudou a passar por cada uma delas, e cada dificuldade vencida foi um aprendizado acrescentado em minha vida.

Aos meus pais, que desde o início de minha vida acadêmica, se esforçaram para que eu chegasse até aqui. Vocês foram meu apoio quando precisei de amparo com a maternidade. Ao meu esposo que foi um exemplo de persistência através de cada projeto vencido em seu trabalho. Aos meus sogros que em tudo que precisei puderam me servir. À minha querida filha, que apesar de toda demanda acrescentada sempre foi meu ponto de equilíbrio e o grande motivo de não me deixar desistir de tentar sempre mais uma vez até conquistar o êxito. Para você minha princesa, quero sempre ser um exemplo de esperança e possibilidades! Agradeço também a cada um dos familiares que sempre deixaram uma palavra de força e apoio.

Agradeço à minha orientadora, Profa. Dra. Veridiana de Melo Rodrigues Ávila e ao meu coorientador Dr. Samuel Cota Teixeira que foram anjos enviados por Deus, me animando sempre com palavras positivas e até mesmo quando nem eu mesmo acreditava no meu potencial eles me ensinaram que com persistência somos capazes de chegar ao objetivo.

Agradeço pelas oportunidades que chegaram até mim, principalmente de poder estagiar no Laboratório do Hospital de Clínicas de Uberlândia, este foi um dos acontecimentos mais marcantes que já vivi, lá pude enxergar o valor da vida de uma maneira diferente e conheci pessoas incríveis, além do conhecimento adquirido que foi de extrema valia. Tive oportunidade de fazer grandes amizades que levarei comigo até o fim da minha vida se assim Deus permitir, como a Nathanny, desde o início tem me servido de apoio em palavras e carinho para concluir esse ciclo da minha vida.

Agradeço a todas boas amizades que até aqui conquistei através da faculdade, muitas vezes me servindo de amparo quando mais precisei. Aos meus amigos Ana Carolina Franco, Émelin alves, Igor Carrijo, Caroline Rodrigues, Rebeca Cristina, Adriana Peres, Jhennyffer Rodrigues e tantos outros, deixo aqui meu carinho e gratidão.

E não poderia deixar de mencionar o meu carinho com minha querida prima Mical Rodrigues que hoje já mora com Deus, tenho certeza de que estaria orgulhosa com minha conquista. Você foi muito além de uma irmã, e fez muita falta durante esse meu percurso. Sua existência em minha memória é uma luz no meu caminho!

**Para começar um grande projeto é preciso valentia. Para terminar um grande projeto é preciso perseverança.**

## RESUMO

A toxoplasmose é uma infecção causada pelo parasito *Toxoplasma gondii* que ocorre mundialmente sendo um sério problema de saúde pública. Gestantes e pessoas imunodeprimidas são mais susceptíveis às complicações da doença. O tratamento padrão para essa doença está associado com graves efeitos colaterais, onde muitas vezes o paciente pode não dar continuidade ao tratamento. As peçonhas de serpentes são uma rica fonte de compostos ativos, atraindo assim grande interesse por parte das indústrias farmacêuticas, sendo que já existem diversos trabalhos descritos na literatura descrevendo diferentes atividades farmacológicas apresentadas por essas substâncias. BpMP-I é uma metaloprotease purificada da peçonha de *Bothrops pauloensis*, a qual apresenta atividade proteolítica sobre o fibrinogênio, não causa hemorragia e dentre as metaloproteases purificadas de *B. pauloensis*, é a que apresenta maior recuperação proteica. O presente trabalho buscou avaliar os efeitos da BpMP-I sobre proliferação e invasão do *Toxoplasma gondii* em cultura de células HeLa e sobre o perfil de citocinas produzidas por essas células nessas condições. Esses parâmetros foram avaliados através dos ensaios de MTT,  $\beta$ -galactosidase e ELISA. BpMP-I foi capaz de reduzir a proliferação intracelular de *T. gondii* em células HeLa, reduziu a susceptibilidade de células HeLa frente a infecção experimental por *T. gondii* e induziu o aumento da liberação das citocinas IL-6, IL-8 e MIF em células HeLa infectadas por *T. gondii*. Foi verificado que o controle do parasitismo mediado pela BpMP-I depende de sua atividade catalítica. Por fim, nosso estudo apontou a BpMP-I como uma promissora molécula, a qual pode ser futuramente utilizada como um modelo para o desenho de novos antiparasitários para o tratamento alternativo da toxoplasmose congênita.

Palavras-chave: *Bothrops pauloensis* metaloprotease, peçonha de serpentes, *Toxoplasma gondii*.

# Sumário

1. INTRODUÇÃO .....	10
1.1 <i>Toxoplasma gondii</i> .....	10
1.2 Ciclo de vida de <i>T. gondii</i> .....	11
1.3 Resposta imune .....	14
1.4 Tratamento .....	16
1.5 Peçonha de serpentes .....	17
1.6 Metaloproteases .....	18
1.7 Ação anti- <i>T. gondii</i> de toxinas de serpentes .....	19
2.0 Objetivos .....	21
2.1 Objetivo geral.....	21
2.2 Objetivos específicos .....	21
3.0 Material e Métodos .....	21
3.1 Obtenção da peçonha.....	21
3.2 Atividade azocaseinolítica.....	22
3.3 Cultura celular.....	23
3.4 Manutenção de <i>T. gondii</i> .....	23
3.5 Viabilidade celular por MTT .....	23
3.6 Ensaio de proliferação intracelular de <i>T. gondii</i> .....	24
3.7 Ensaio de invasão celular por <i>T. gondii</i> .....	25
3.8 Quantificação de citocinas .....	25
3.9 Avaliação do papel da atividade catalítica da BpMP-I no controle da proliferação intracelular de <i>T. gondii</i> .....	25
3.10 Análise estatística .....	26
4.0 Resultados .....	26
4.1 BpMP-I não altera a viabilidade de células HeLa .....	26



4.2 BpMP-I é capaz de reduzir a proliferação intracelular de <i>T. gondii</i> em células HeLa .....	27
4.3 BpMP-I reduz a susceptibilidade de células HeLa frente a infecção experimental por <i>T. gondii</i> .....	28
4.4 O tratamento com BpMP-I aumenta a liberação das citocinas IL-6, IL-8 e MIF em células HeLa infectadas por <i>T. gondii</i> .....	29
4.5 O controle do parasitismo mediado por BpMP-I depende de sua atividade catalítica.....	30
5.0 Discussão.....	31
6.0 Referências bibliográficas .....	36



## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 *Toxoplasma gondii*

*Toxoplasma gondii*, protozoário parasita intracelular obrigatório amplamente distribuído na natureza, pertence ao filo Apicomplexa, ordem Eucoccidiida, família Sarcocystidae e subfamília Toxoplasmatinae (LEVINE, 1988). *T. gondii* é o agente etiológico da toxoplasmose, sendo capaz de infectar uma ampla gama de organismos, incluindo todos os animais de sangue quente (DEBIERRE-GROCKIEGO, 2010; ROBERT GANGNEUX et al., 2015).

A infecção por *T. gondii* é um sério problema de saúde pública mundial, mas com baixa prevalência em populações da América do Norte, sudeste da Ásia, Europa setentrional e alguns países africanos. Contudo, acomete cerca de 50% da população em países da Europa central, com maior soro prevalência em países da América Latina. Apesar da toxoplasmose estar distribuída em diferentes partes do mundo, se apresenta com uma elevada prevalência em regiões tropicais, devido as condições ambientais e epidemiológicas serem favoráveis ao desenvolvimento e transmissão do parasito. Segundo estudo soropidemiológicos em humanos no Brasil, os índices de prevalência da infecção podem chegar até 80%. (ROBERT-GANGNEUX; DARDÉ, 2012).

Em indivíduos imunocompetentes a infecção geralmente é assintomática, no entanto, em indivíduos imunocomprometidos ou em recém-nascidos ou adolescentes (CAPOBIANGO et al., 2014), a doença pode levar à quadros sintomáticos graves como retinocoroidite e lesões no sistema nervoso central, no caso de grávidas pode levar até ao aborto (SILVEIRA et al., 2015). A severidade das manifestações clínicas da toxoplasmose depende de vários fatores, entre eles o tipo da cepa infectante de *T. gondii* e a resposta imune do hospedeiro (MONTROYA; REMINGTON, 2008).

Os mecanismos de invasão de *T. gondii* na célula hospedeira estão relacionados com processos de reconhecimento, adesão e formação de vacúolo parasitóforo e de multiplicação no interior de células hospedeira, que envolvem uma série de antígenos de superfície como (SAG), proteínas de micronemas (MIC),

proteínas de roptrias (ROP e RON) e proteínas de grânulos densos (GRA) (DE SOUZA & BELFORT, 2014).

Devido a gravidade desta doença, diversos estudos *in vitro* vem sendo realizados com objetivo de entender melhor os aspectos comportamentais, imunopatológicos e parasitológicos de *T. gondii*, possibilitando assim o diagnóstico e o desenvolvimento de tratamentos mais avançados no combate desta infecção (SANFELICE et al., 2019).

## 1.2 Ciclo de vida de *T. gondii*

O ciclo de vida de *T. gondii* é heteróxico, onde o ciclo sexuado acontece no intestino do hospedeiro definitivo, que compreende a família dos felídeos, sendo mais comum o gato doméstico (**Figura 1**). O ciclo assexuado pode ocorrer em diferentes animais, pois este parasito pode infectar uma variedade de espécies (GAZZINELLI et al., 2014). Todos os integrantes dessa subfamília apresentam ciclo heteróxico, ou seja, necessitam mais de um hospedeiro para completar seu ciclo, e oocisto do tipo isospora, isto é, apresenta dois esporocistos (estrutura que produz esporos assexuados), contendo quatro esporozoítos cada (DE SOUZA; BELFORT, 2014). *T. gondii* se apresenta através de três estágios (formas) infectantes em seu ciclo de vida: taquizoítos, bradizoítos e esporozoítos. Os taquizoítos se multiplicam de maneira acelerada nos tecidos, espalham-se rapidamente por quase todos os órgãos. Ao atingirem tecidos específicos, reduzem seu metabolismo e se transformam em bradizoítos que permanecem quiescentes no interior de um cisto formado nos tecidos, o que leva a uma infecção crônica (CALERO-BERNAL, GENNARI, 2019).

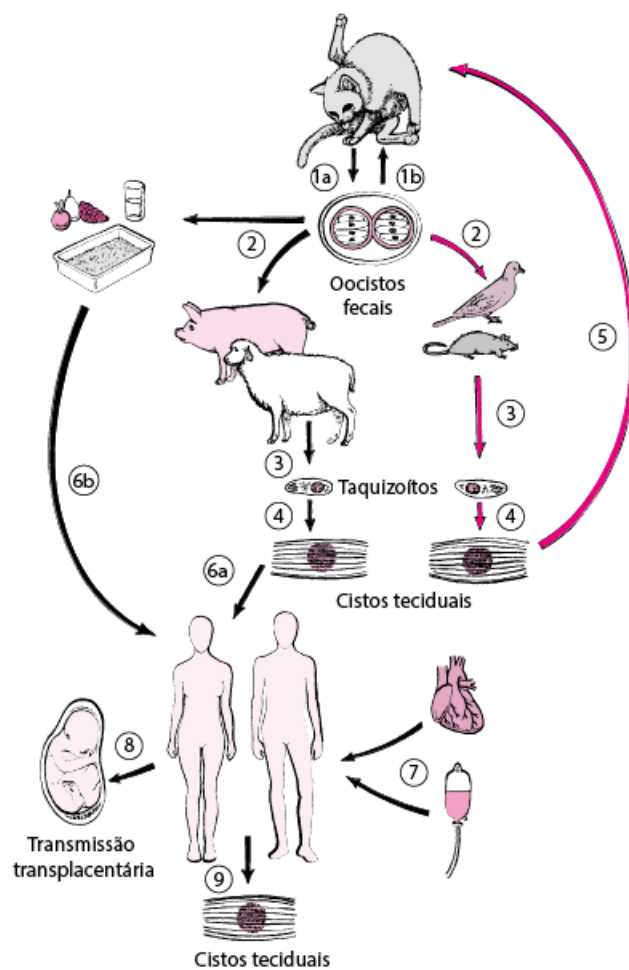
A infecção dos hospedeiros intermediários sucede através do consumo de alimentos ou água contaminadas com oocistos esporulados ou de carne malcozida contendo cistos. Ao entrar em contato com o conteúdo estomacal, enzimas proteolíticas presentes no estômago destroem a parede do oocisto ou cistos, liberando assim esporozoítos (ooocistos), ou bradizoítas (cistos), na luz do intestino, que invadirão ativamente as células intestinais epiteliais superficiais dos hospedeiros. No interior das células existem compartimentos chamados de vacúolos parasitóforos nos

quais ocorrem a diferenciação em taquizoítos, iniciando-se uma replicação assexuada rápida por endodiogenia com consequente aumento da carga parasitária (SPEER & DUBEY, 2005; FERGUSON, 2009).

Finalizado o ciclo de replicação inicial, as células hospedeiras se rompem liberando parasitos que irão infectar outras células. Após o controle da fase aguda da infecção, os taquizoítas que mantiveram vivos se diferenciam em bradizoítas, e então formam cistos intracelulares, tendo preferência pelo tecido muscular e nervoso. Com a formação desses cistos, o hospedeiro já se encontrará em fase crônica da toxoplasmose, seguindo até o fim da vida. A fase crônica tem grande relevância para a continuidade do ciclo, pois é através da predação dos felídeos que ocorre uma nova infecção, onde os cistos ingeridos entrarão em contato com o conteúdo estomacal dos felinos e então bradizoítas serão liberados, invadindo as células epiteliais do intestino, replicando-se de forma assexuada (DUBEY, 1998; GAZZINELLI et al., 2014; ROUGIER; MONTOYA; PEYRON, 2016). Em seguida, os bradizoítas irão se transformar em merozoítas por esquizogonia, e as células que os abrigam se rompem. Os merozoítas, já fora das células, são transformados em gametas masculinos e femininos (por gamogonia) que logo se fundirão, formando oocistos não esporulados, sendo esses expelidos através das fezes dos felídeos, que ao entrarem em contato com o meio externo se tornarão oocistos esporulados, podendo assim reiniciar um novo ciclo (DUBEY, 1998; GAZZINELLI et al., 2014; ROUGIER; MONTOYA; PEYRON, 2016).

Dentre as vias de transmissão, a transplacentária (transmissão vertical da toxoplasmose) ocorre quando a mãe é infectada durante a gravidez (ou pouco antes da gestação) através da ingestão de oocistos ou cistos teciduais. Enzimas proteolíticas presentes no estômago promovem a destruição da parede do oocisto, e liberando assim os esporozoítos na luz do intestino que irão invadir ativamente as células intestinais epiteliais superficiais, alcançando outros tipos de células de diferentes tecidos rapidamente através da circulação sanguínea e/ou linfática, e então atravessando a barreira placentária, multiplicando-se exacerbadamente nos tecidos fetais os quais ainda não apresentam um sistema imunológico maduro, podendo levar a lesões neurológicas e/ou oculares no nascimento, até mesmo ao aborto; podendo

também  
infecção latente  
clínicos irão se  
meses ou anos  
(DE SOUZA &



apresentar uma  
que os sinais  
manifestar apenas  
após o nascimento  
BELFORT, 2014).

*Figura 1 - Ciclo de vida de Toxoplasma gondii. 1a. Os oocistos são eliminados nas fezes dos gatos. 1b. Os gatos se reinfectam pela ingestão de oocistos esporulados. 2. Terra, água, plantas, ou a areia do gato tornam-se infectados com oocistos. Os hospedeiros na natureza (p. ex., pássaros, roedores, animais selvagens e animais criados para consumo de seres humanos) infectam-se após ingerirem materiais infectados. 3. Os oocistos se desenvolvem em taquizoítas logo após a ingestão. 4. Os taquizoítas se disseminam por todo o corpo e formam cistos teciduais no tecido neural, ocular e muscular. 5. Os gatos se infectam após consumirem hospedeiros intermediários contendo cistos teciduais. 6a. Os seres humanos podem se infectar pela ingestão de carne malcozida contendo cistos teciduais. 6b. Os seres humanos podem se infectar pela ingestão de alimentos ou água contaminada por fezes de gatos ou outros materiais contaminados por fezes (p. ex., terra), ou pelo contato com a areia do gato. 7. Raramente, a infecção nos seres humanos é decorrente de hemotransfusão ou transplante de órgão. 8. Raramente, ocorre transmissão transplacentária da mãe para o feto. 9. No hospedeiro humano, os parasitas formam cistos teciduais, mais comumente no músculo esquelético, no miocárdio, no cérebro e nos olhos.*

Fonte: <https://www.msmanuals.com/pt/profissional/multimedia/figure/ciclo-de-vida-do-toxoplasma-gondii>. 03 de janeiro de 2023. (modificado)

### 1.3 Resposta imune

Para obter sucesso em seu processo de infecção, faz-se necessário que o parasito se adapte e integre ao meio (organismo do hospedeiro) vencendo todas as barreiras geradas pela resposta imune do hospedeiro frente à infecção. Devido ao modo que invadem a célula alvo, taquizoítas de *T. gondii* encontram-se livres de alguns mecanismos de ação da resposta imune do hospedeiro, como acidificações e hidrolases endolisossomais, processos que microrganismos extracelulares precisam enfrentar, o que facilita a efetivação da infecção por esse patógeno (CARRUTHERS e BOOTHROYD, 2007).

Por meio de adaptações do hospedeiro imunocompetente, *T. gondii* é capaz de se instalar sem promover a doença, garantindo sua sobrevivência e permanência (TENTER et al., 2000; LANG et al., 2007). Assim, por ser um parasito intracelular obrigatório, este necessita promover uma relação equilibrada com seus hospedeiros intermediários a fim de possibilitar sua sobrevivência e longa duração na célula.

O resultado da infecção por *T. gondii* depende de vários fatores, como a virulência da cepa do parasito e das características genéticas, de como se encontra o

sistema imunológico e a resposta imunológica do hospedeiro, dentre outros. Quando o hospedeiro é infectado por *T. gondii*, as formas taquizoítas proliferam em vários órgãos de modo que o sistema imunológico do hospedeiro reaja liberando uma resposta imune através da ativação celular e produção de mediadores microbicidas, citocinas e anticorpos; porém, por meio de mecanismos de defesa, o parasito pode interferir nesse processo de sinalização celular, fazendo com que ele sobreviva levando a uma infecção crônica na forma de cistos de bradizoítas, principalmente no tecido muscular e no sistema nervoso central (SNC) (DE SOUZA & BELFORT, 2014).

Quando se trata de hospedeiros imunocompetentes, mediante uma infecção por *T. gondii*, há uma potente resposta imune celular, de modo que haja controle do parasito por intermédio da lise de células infectadas. Esse processo se dá principalmente pela ação de células do sistema imune adaptativo capazes de induzir a morte de células infectadas por meio de mecanismos citotóxicos, como os linfócitos T CD8<sup>+</sup> e células *Natural Killer* (NK), ou pela liberação de citocinas ativadas pelas células infectadas, impedindo assim a multiplicação parasitária (DE SOUZA & BELFORT, 2014). Inicialmente, quando ocorre a infecção por *T. gondii*, gera-se uma série de mecanismos envolvendo elementos da resposta imune inata, como macrófagos, células dendríticas e células NK, além de outras células de natureza não hematopoiéticas (HAUSER et al., 1983). A indução da resposta imunológica contra *T. gondii* acontece através da ação da citocina IL-12 produzida por macrófagos, neutrófilos e especialmente por células dendríticas, resultando na diferenciação e expansão clonal de células de perfil Th1 (SHER et al., 1993; GAZZINELLI et al., 1993). Essas células secretam IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e TNF- $\beta$  e IL-2 que irão ativar reações mediadas por células. As células de perfil Th2 secretam outras citocinas como IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13 que auxiliam na produção de anticorpos (CHERWINSKI et al., 1987).

IFN- $\gamma$  é a principal citocina envolvida no controle da infecção por *T. gondii* (SUZUKI et al., 1988), desempenhando importante papel na resposta imunológica de hospedeiros imunocompetentes, promovendo imunidade protetora de longa duração (DE SOUZA & BELFORT, 2014). Além de outras atividades biológicas como ativação dos mecanismos microbicidas de macrófagos e a promoção da citotoxicidade de linfócitos TCD8<sup>+</sup> (MCCABE et al., 1984). Essa citocina também está envolvida na



conversão de taquizoítas em bradizoítas e, ao mesmo tempo, na prevenção da ruptura dos cistos teciduais, não ocorrendo assim a reativação do parasito no hospedeiro (BOHNE et al., 1993; SKARIAH et al., 2010). Porém a depleção de IFN-g na fase crônica pode levar a reativação da infecção (DE SOUZA & BELFORT, 2014).

*T. gondii* têm a capacidade de modular a resposta imune do hospedeiro através de diversos mecanismos, a fim de se manter viável nas células hospedeiras (DENKERS, 2003). Um bom exemplo seria a secreção de IL-10 induzida pelo parasito que pode desativar macrófagos, levando à diminuição da produção de IFN-g e conseqüentemente redução de atividade microbicida, facilitando sua sobrevivência (BOGDAN e NATHAN, 1993). Outra via de modulação pelo *T. gondii* seria sua ação na apoptose, pois não é interessante para o parasito que a célula hospedeira sofra danos, a fim de levar a morte celular, e isso pode ser crítico para o curso da infecção (LUDER e GROSS, 2005).

#### 1.4 Tratamento

Após o diagnóstico, o tratamento da toxoplasmose depende da gravidade da infecção e do estado de saúde geral do paciente. Em indivíduos imunocompetentes com infecção assintomática, o tratamento pode não ser necessário, pois o sistema imunológico pode controlar a infecção. No entanto, em casos mais graves como gestantes ou em indivíduos com sistema imunológico comprometido, o tratamento com antiparasitários é recomendado (PRADO et al., 2011). O uso da espiramicina é indicado no tratamento da infecção materna no primeiro trimestre gestacional quando não apresenta infecção fetal. Quando apresenta infecção fetal é acrescentado o uso da sulfadiazina. O tratamento com pirimetamina é indicado a partir do terceiro trimestre gestacional, devido ao seu efeito teratogênico. Nesse período o tratamento é realizado juntamente com a sulfadiazina e ácido fólico, esse é administrado a fim de compensar o efeito depressor medular ocasionado pela pirimetamina. (BELÁ, 2007; MONTOYA; REMINGTON, 2008; ALDAY, DOGGETT, 2017; Brasil, Ministério da Saúde, 2010).

Apesar dos atuais esforços globais para eliminar esta infecção parasitária, a terapia convencional para toxoplasmose tem sido associada à graves efeitos colaterais e toxicidade, como mielotoxicidade, distúrbios gastrointestinais e efeitos

teratogênicos no feto em caso de transmissão vertical, bem como o desenvolvimento de cepas de *T. gondii* resistentes à drogas (MONTROYA E LIESENFELD, 2004; DOLIWA et al., 2013; SILVA et al., 2017). Assim, é importante o estabelecimento de novas estratégias terapêuticas que possam controlar a infecção por *T. gondii* e que, ao mesmo tempo, minimizem os efeitos colaterais indesejados.

### 1.5 Peçonha de serpentes

As peçonhas de serpentes são constituídas por uma complexa mistura farmacológica ativa de proteínas e polipeptídios, juntamente com compostos orgânicos de baixa massa molecular, como citrato, carboidratos, nucleotídeos e, em menor proporção, aminoácidos livres e lipídeos; gerando assim, um grande interesse dos pesquisadores de compreender suas características bioquímicas como particularidades estruturais, assim como seus mecanismos de ação (SOUZA et al., 2001).

A peçonha do gênero *Bothrops* é composta por uma diversidade de toxinas como metaloproteases, serinoproteases, desintegrinas, miotoxinas, fosfolipases A2 (PLA2), L-aminoácido oxidases (LAAOs), fosfomonoesterases, fosfodiesterases, acetilcolinesterase, arginina esterase, hialuronidase, 5`- nucleotidase e NAD – nucleosidase (ZELANIS et al.,2010; RODRIGUES et al., 2012).

Rodrigues et al. (2012) demonstraram através de técnicas proteômicas e transcriptômicas que há uma variedade de toxinas presentes na peçonha de *B. pauloensis*, sendo as que mais se destacam por sua atividade enzimática são as metaloproteases, PLA2, serinoproteases e LAAOs. Vários estudos e pesquisas vêm sendo realizados para caracterizar estruturalmente e funcionalmente seus mecanismos de ação, bem como seus potenciais terapêuticos. Neste cenário, a literatura científica tem reportado a ação destas toxinas quanto aos seus efeitos antitumoral (GUIMARÃES, et al., 2017; AZEVEDO et al., 2019), antiangiogênico (POLLONI et al., 2021; AZEVEDO et al., 2022), antibacteriano (RODRIGUES et al., 2004), antiviral (TEIXEIRA et al., 2020) e antiparasitário (TEIXEIRA et al., 2021; BARBOSA et al., 2021).

## 1.6 Metaloproteases

Metaloproteases são enzimas hidrolíticas classificadas como endopeptidases, também consideradas como proteínas pertencentes à superfamília Metzincin, caracterizadas por terem um domínio de ligação a algum metal (zinco, cobalto, níquel ou manganês), e de serem dependentes de interações com este íon em seu sítio catalítico para se tornarem ativas e exercerem suas atividades. Elas apresentam um “*motif*” bem conservado, composto por três resíduos de histidina (de PAULA et al, 2014; FOX SERRANO, 2008).

As metaloproteases podem ser solúveis ou ancoradas às membranas e atuam sobre substratos específicos, dentre eles estão os componentes da matriz extracelular (ECM), citocinas, quimiocinas, fatores de crescimento, receptores de fatores de crescimento e receptores de adesão da superfície celular (ACHÊ., 2013; de PAULA et al, 2014; FOX; SERRANO, 2008; MARKLAND; SWENSON, 2013).

As metaloproteases estão presentes desde bactérias até mamíferos, sendo divididas em quatro níveis hierárquicos (Classe, Tribo, Clã e Família) conforme suas semelhanças estruturais do motivo de ligação do zinco, sítio de ligação do substrato e motivos envolvidos na catálise (GOMIS-RÜTH et al. 2003; GOMIS-RÜTH et al. 2012).

As metaloproteases de peçonhas de serpentes (*Snake Venom Metalloproteinase* - SVMP) são os compostos que estão em maior abundância na peçonha de serpentes Viperidae (FOX e SERRANO, 2008). Tais enzimas possuem grande variedade estrutural e funcional (GUTIÉRREZ e RUCAVADO, 2000) sendo classificadas conforme a presença ou ausência de seus variados domínios estruturais (FOX e SERRANO, 2008).

A estrutura das SVMPs é composta pelo peptídeo sinal e pró-domínio (ambos se perdem quando madura), domínio metaloprotease, interdomínio e ainda possui regiões que variam de acordo com a classe, podendo apresentar domínios desintegrina, tipo desintegrina, rico em cisteína e domínio lectina tipo-C (FOX E SERRANO, 2008). As SVMPs são classificadas em três classes de acordo com os seus domínios estruturais. As de classe P-I compreendem as proteínas somente com

o domínio catalítico (metaloprotease) na forma madura, e podem possuir pouca ou nenhuma atividade hemorrágica. As SVMPs da classe P-II possuem um domínio desintegrina na sua estrutura na forma ativa. As SVMPs de classe P-III possuem uma alta atividade hemorrágica, se diferenciando das demais por possuírem na sua estrutura domínios *desintegrin-like* e domínios ricos em cisteína (FOX E SERRANO, 2008; OLAOBA, et al. 2020; TAKEDA et al., 2012). Cada domínio presente nas metaloproteases apresentam função específica, e algumas atividades de SVMPs atribuídas a um dos domínios são potencializadas pela presença de um outro domínio. O domínio metaloproteinase representa o domínio cataliticamente ativo de todas as classes de SVMPs.

Apesar das SVMPs estarem associadas à uma série de manifestações clínicas durante os acidentes ofídicos, estas vêm sendo cada vez mais estudadas como possíveis agentes terapêuticos (CASEWELL et al., 2015), pelo fato de apresentarem ação sobre proteínas do sistema hemostático como fibrinogênio, fator X, protrombina, dentre outros (NAVES, et al., 2012), tornando-as moléculas com alto valor biológico. Vários trabalhos na literatura têm reportado o potencial antimicrobiano, cicatrizante, antitumoral, antiangiogênico e analgésico das SVMPs (CALDERON et al., 2014; CARLSON; ROURK; DESAI, 2014; CHELLAPANDI, 2014; ACHÊ, et al., 2015; OLIVEIRA et al., 2017).

### **1.7 Ação anti-*T. gondii* de toxinas de serpentes**

A ação de toxinas isoladas de peçonha de serpentes sobre *T. gondii* ainda é pouco estudada. Borges e colaboradores (2016) mostraram efeito antiparasitário sobre *T. gondii* induzido pela BnSP-7 (uma PLA2-Lys49 homóloga da peçonha de *B. pauloensis*). Neste estudo, os autores promoveram o pré-tratamento de taquizoítos com a toxina por 30 minutos antes da interação com células HeLa e os resultados demonstraram que a adesão desses parasitos foi significativamente reduzida quando comparada com o grupo não tratado. Além disso, também foi observado que a BnSP-7, em concentrações não tóxicas à célula hospedeira, foi capaz de diminuir a

proliferação intracelular do parasita pré-tratado, provavelmente por uma modulação da resposta imune das células HeLa (BORGES et al., 2016). Semelhantemente, foi demonstrado que BpirLAAO-I, uma LAAO isolada de *B. pirajai*, inibiu tanto a invasão quanto a proliferação intracelular de *T. gondii* em uma linhagem de fibroblasto humano (IZIDORO et al., 2011).

Além destes dois estudos, um com PLA2 e outro com LAAO, apenas um único trabalho demonstra a ação anti-*T. gondii* de uma SVMP. Bastos e colaboradores (2008), mostraram o efeito de uma metaloprotease da classe P-I (neuwiedase) isolada da peçonha de *B. pauloensis* sobre fibroblastos humanos previamente infectados com *T. gondii*. Os autores promoveram o tratamento com neuwiedase em células hospedeiras previamente infectadas com *T. gondii* ou no parasito antes da infecção. Quando os tratamentos foram feitos antes ou depois da infecção, as taxas de infecção foram inibidas em 71% e 61%, respectivamente (BASTOS et al., 2008).

Este estudo pioneiro de Bastos *et al.* (2008) revelou uma possível promissora atividade anti-*T. gondii* mediada por SVMPs; contudo, os mecanismos de ação que expliquem o efeito antiparasitário desta classe de toxinas ainda permanecem pouco esclarecidos. Nesse sentido, o presente estudo busca uma maior compreensão da ação anti-*Toxoplasma* de SVMPs. Para tal, utilizamos uma outra SVMP, também de classe P-I (BpMP-I), isolada por Naves de Souza e colaboradores (2012) a partir da peçonha bruta de *B. pauloensis*.

BpMP-I possui massa molecular de aproximadamente 23 kDa em condições redutoras e 20 kDa em condições não redutoras. Apresenta atividade proteolítica sobre a azocaseína, e sobre as cadeias  $\alpha$ A e  $\beta$ B do fibrinogênio, não causa hemorragia e dentre as metaloproteases purificadas da peçonha de *B. pauloensis*, é a que apresenta maior recuperação proteica (NAVES DE SOUZA et al., 2012).

Levando em consideração o potencial terapêutico de SVMPs, bem como o bom rendimento proteico e elevada homologia estrutural com domínios metaloproteases presentes em diferentes SVMPs, BpMP-I configura uma valiosa molécula para melhor entender os mecanismos de ação envolvidos na infecção por *T. gondii*, permitindo assim a elucidação de possíveis alvos moleculares para o tratamento alternativo da toxoplasmose.

## 2.0 Objetivos

### 2.1 Objetivo geral

Avaliar a ação *in vitro* de uma metaloprotease (BpMP-I) em células HeLa frente à infecção experimental por *T. gondii*.

### 2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a citotoxicidade da BpMP-I em células HeLa;
- Determinar o índice de proliferação intracelular de *T. gondii* (cepa RH, clone 2F1) em células HeLa frente ao tratamento com concentrações não citotóxicas da BpMP-I;
- Verificar o efeito do pré-tratamento de células HeLa com BpMP-I na invasão celular;
- Verificar a capacidade da BpMP-I em modular a produção de citocinas pró- e anti-inflamatórias em células HeLa infectadas por *T. gondii*;
- Investigar o papel da atividade catalítica mediada pela BpMP-I no controle da infecção por *T. gondii*.

## 3.0 Material e Métodos

### 3.1 Obtenção da peçonha

A peçonha bruta de *Bothrops pauloensis* foi obtida a partir de espécimes mantidas no Serpentário CETA- Centro de Extração de Toxinas Animais Ltda - CNPJ: 08.972.260/0001-30, estabelecido na estrada municipal Couto e Silvas - Sítio São Jorge Silvas - Morungaba, SP - CEP: 13260-000. Este serpentário possui comprovante de registro no Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (cadastro: 2087163). A peçonha bruta de *B. pauloensis* foi

utilizada para a purificação da metaloprotease BpMP-I de acordo com a metodologia descrita por Naves de Souza (2012). Após purificação a proteína foi armazenada a  $-20^{\circ}\text{C}$  no Bando de Toxinas do Laboratório de Bioquímica e Toxinas Animais do Instituto de Biotecnologia da Universidade Federal de Uberlândia. A BpMP-I foi purificada e cedida de acordo com a demanda necessária à realização dos experimentos delineados no presente estudo.

Para certificar o grau de homogeneidade da proteína isolada foram realizadas eletroforeses em gel de poliacrilamida a 12,5 % (m/v) em condições redutoras, na presença de SDS e  $\beta$ -mercaptoetanol, segundo metodologia descrita por Laemmli (1970). As dosagens proteicas foram realizadas conforme ensaio de Bradford (1976).

### **3.2 Atividade azocaseinolítica**

A atividade proteolítica da BpMP-I sobre a azocaseína foi realizada segundo (GOMES et. al 2015) com modificações. A solução de azocaseína (1mg/mL) foi preparada com tampão Tris 0,05M e NaCl 0,15M com pH 7,80, acertado com HCl. Em seguida, essa solução foi colocada em uma placa de 96 poços (160 $\mu\text{L}$ /poço). Em seguida, 5  $\mu\text{g}$  de BpMP-I foram pré-incubados com EDTA (1 mM) em um volume final de 45  $\mu\text{L}$ /poço (diluição em PBS 1x) por 1 h a  $37^{\circ}\text{C}$ . Como controles experimentais, utilizamos 5  $\mu\text{g}$  da toxina e da peçonha bruta de *B. pauloensis* na ausência de EDTA. Em seguida, 45  $\mu\text{L}$  dos compostos foram adicionados aos poços contendo previamente a solução tampão e deixado incubar por 30 minutos a  $37^{\circ}\text{C}$ . Após, foram adicionados 45 $\mu\text{L}$  da solução de tricloroacético 20% (m/v). A placa foi deixada por 30 minutos em temperatura ambiente e posteriormente centrifugada a 4500 rpm por 20 minutos, os sobrenadantes foram transferidos para outra placa e as absorbâncias foram determinadas a 405nm em leitora de microplacas. Uma unidade (U) de atividade azocaseinolítica foi definida como sendo o acréscimo de 0,01 unidades de absorbância a 405nm em relação as condições do ensaio controle. Os ensaios foram realizados em triplicata.

### 3.3 Cultura celular

Células HeLa (células uterinas epiteliais humanas) foram obtidas do *American Type Culture Collection* (ATCC, Manassas, VA, EUA). Estas células foram cultivadas em frascos de 75 cm<sup>2</sup> com meio RPMI-1640 (GIBCO, Paisley, Reino Unido), suplementado com carbonato de sódio 23 mM, HEPES 25 mM, estreptomicina 100 µg/ml, penicilina 100 U/ml (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA) e soro fetal bovino (SFB) inativado pelo calor (Cultilab, Campinas, SP, Brasil) a 10% (meio completo) em incubadora umidificada a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub> (BARBOSA et al. 2008).

### 3.4 Manutenção de *T. gondii*

As formas taquizoítas de *T. gondii* (clone 2F1), derivados da cepa RH, altamente virulentas que expressam β-galactosidase constitutivamente citoplasmática, foram cedidas pelo Dr. Vern Carruthers, Faculdade de Medicina da Universidade de Michigan (EUA). Esses parasitos foram mantidos em células HeLa cultivadas em meio RPMI 1640 suplementado com penicilina, estreptomicina e 2% FBS a 37° C e 5% CO<sub>2</sub>.

### 3.5 Viabilidade celular por MTT

A viabilidade celular na presença da toxina BpMP-I foi realizada em células HeLa por um ensaio colorimétrico, baseado na oxidação mitocondrial do reagente MTT (brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio; azul de tiazolil tetrazole) (Sigma), como previamente descrito por Mosmann (1983), com algumas modificações. Resumidamente, células HeLa foram cultivadas em placas de 96 poços (3,0 x 10<sup>4</sup> células/200µl/poço) em meio completo por 18 h a 37° e 5% de CO<sub>2</sub>. Em seguida, as células foram tratadas com diferentes concentrações de BpMP-I (80 a 0,625 µg/mL) em diluição seriada de 1:2. Após 24 h, os sobrenadantes foram descartados e 10 µL de MTT (5 mg/mL) e 90 µL de meio de cultura com 10% SFB



foram adicionados a cada poço durante 3 h, nas mesmas condições de cultivo. Em seguida, os cristais de formazan foram solubilizados em 10% de dodecil sulfato de sódio (SDS) (Sigma) e 50% de N, N-dimetilformamida. A densidade óptica foi determinada a 570 nm em leitor de placas (Titertek Multiskan Plus, Flow Laboratories, Mc Lean, EUA). Os resultados foram expressos como porcentagem de células viáveis em relação ao controle não tratado (100% da viabilidade).

### 3.6 Ensaio de proliferação intracelular de *T. gondii*

Células HeLa foram cultivadas em placa de cultura de 96 poços ( $3,0 \times 10^4$  células/200  $\mu$ L/poço) em meio RPMI com 10% de SFB por 18 h a 37° C e 5% de CO<sub>2</sub>. Após, células HeLa foram infectadas com taquizoítas de *T. gondii*, na proporção de 3 parasitos por célula (*multiplicity of infection* - MOI 3:1) por 3 h. Após, os poços foram lavados com PBS 1x para remoção dos parasitos extracelulares. Em seguida, células foram tratadas com concentrações intermediárias e não citotóxicas de BpMP-I (20 e 40  $\mu$ g/mL) por 24 h a 37° C e 5% de CO<sub>2</sub>. Para o grupo controle, as células foram incubadas apenas com meio de cultura. Além disso, células na ausência de infecção, também receberam os mesmos tratamentos experimentais mencionados acima. Os sobrenadantes foram coletados e mantidos no freezer a -80°C para posterior medição de citocinas. Para quantificação da proliferação intracelular de *T. gondii*, as células foram submetidas ao ensaio colorimétrico de  $\beta$ -galactosidase, conforme descrito anteriormente por TEO et al. (2007).

Resumidamente, as células HeLa infectadas foram incubadas com 100  $\mu$ L de tampão de lise (100 mM HEPES, 1 mM MgSO<sub>4</sub>, 0,1% Triton X-100, 5 mM ditioneitol) durante 15 minutos. Em seguida, os lisados foram misturados com 160  $\mu$ L de tampão de ensaio (tampão fosfato 100 mM pH 7,3,  $\beta$ -mercaptoetanol 102 mM, MgCL<sub>2</sub> 0,1 mM) e, posteriormente, com 40  $\mu$ L de CPRG 6,25 mM (vermelho de clorofenol- $\beta$ -D-galactopiranosídeo; Roche, Indianápolis, IN, EUA). A atividade da  $\beta$ -galactosidase foi medida a 570 nm usando um leitor de microplacas (Titertek Multiskan Plus, Flow Laboratories) e os dados foram apresentados como porcentagem de taquizoítas, usando uma curva padrão com concentração conhecida de taquizoítas (variando de  $1 \times 10^6$  a  $15,625 \times 10^3$ ).

### **3.7 Ensaio de invasão celular por *T. gondii***

Para realizar este ensaio, células HeLa ( $3,0 \times 10^4$  células/200  $\mu$ L/poço) foram plaqueadas em placa de 96 poços (Ciencor Scientific, Brasil) e deixadas por 18 h a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Em seguida, as células foram tratadas com BpMP-I (20 e 40  $\mu$ g/mL) durante 24 h. Após este tempo, o tratamento foi removido, e as células foram infectadas com taquizoítas de *T. gondii* (MOI 3:1), e deixados para invadir por 3 h. Após esse tempo os poços foram lavados e realizada a reação de  $\beta$ -galactosidase para quantificar o número de parasitos que invadiram as células, assim como descrito no item 3.6.

### **3.8 Quantificação de citocinas**

A liberação de citocinas nos sobrenadantes de células HeLa tratadas ou não com BpMP-I na presença ou ausência de *T. gondii* foi quantificada através do Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (ELISA). A quantificação dos níveis de IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ , IL-10 (OpTEIA, BD Bioscience, San Diego, CA, EUA) e MIF - Fator inibidor da migração de macrófagos (Duoset R&D Systems, Minneapolis, MN, EUA) foi realizado de acordo com as instruções do fabricante. A concentração proteica das citocinas foi expressa em pg/mL. Os limites de detecção de cada citocina foram determinados a partir das curvas padrão: IL-6 (4,7 pg/mL), TNF- $\alpha$  (7,8 pg/mL), MIF (7,8 pg/mL), IL-10 (7,8 pg/mL) e IL-8 (3,125 pg/mL).

### **3.9 Avaliação do papel da atividade catalítica da BpMP-I no controle da proliferação intracelular de *T. gondii***

Células HeLa foram plaqueadas em placa de cultura de 96 poços (Ciencor Scientific, Brasil) ( $3,0 \times 10^4$  células/200  $\mu$ L/poço) em meio RPMI com 10% de SFB por 18 h a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Após, células HeLa foram infectadas com taquizoítas de *T. gondii* (MOI 3:1) por 3 h. Após, os poços foram lavados com PBS 1x para remoção dos parasitos extracelulares. Em seguida, células foram tratadas por 24 h com BpMP-

I (40 µg/mL), BpMP-I (40 µg/mL) pré-incubada por 1 h com EDTA (1 mM), EDTA (1 mM) e meio de cultura. Após 24 h de tratamento, realizamos a quantificação da proliferação intracelular de *T. gondii* pela reação da β-galactosidase, conforme descrito no item 3.5.

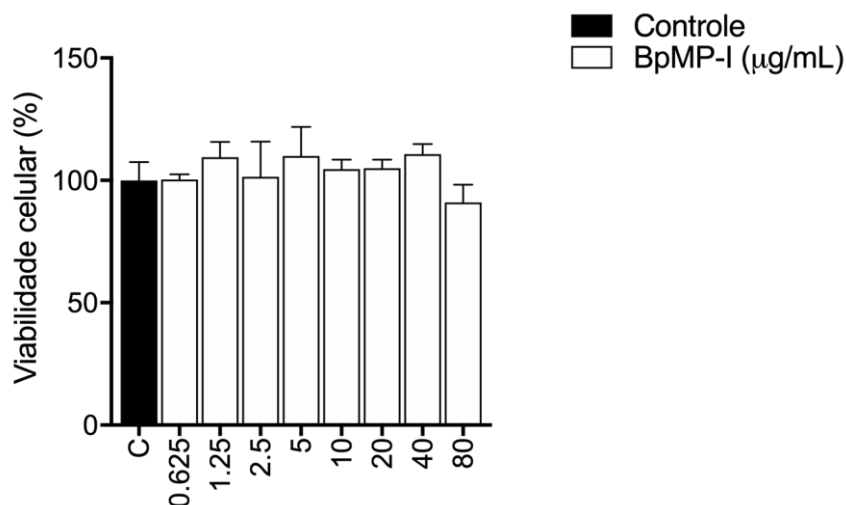
### **3.10 Análise estatística**

Todos os dados representam a média e o desvio padrão de três experimentos independentes que foram realizados em triplicata. As diferenças entre tratamentos e controles foram avaliadas por análise de variância (One way ANOVA), seguido por teste de comparações múltiplas de Tukey, utilizando o software GraphPad Prisma 8.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, EUA). A significância estatística foi considerada quando  $P < 0,05$ .

## **4.0 Resultados**

### **4.1 BpMP-I não altera a viabilidade de células HeLa**

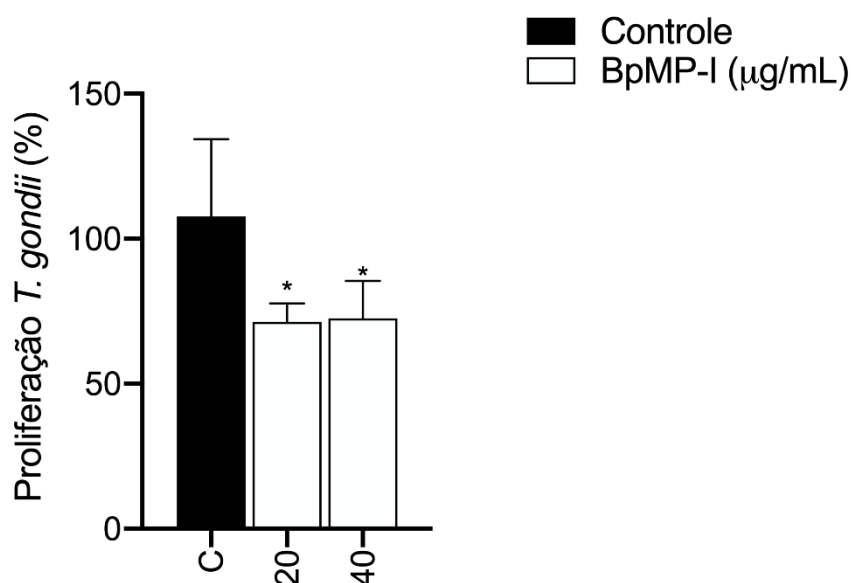
Antes da realização dos ensaios de proliferação intracelular e invasão do parasito *T. gondii*, células HeLa foram tratadas por 24 h com diferentes concentrações de BpMP-I a fim de selecionar concentrações não tóxicas para a célula hospedeira. Observamos que BpMP-I não demonstrou toxicidade contra as células HeLa em nenhuma das concentrações testadas, sem diferença significativa em relação ao controle ( $P > 0,05$ ; Fig. 2). Foram selecionadas para os próximos experimentos as concentrações intermediárias e não citotóxicas de 20 e 40 µg/mL.



**Figura 2.** Viabilidade da célula hospedeira pelo ensaio MTT. Células HeLa foram tratadas por 24 h em diluições seriadas (variando de 80 a 0,625  $\mu\text{g/mL}$ ) com a toxina BpMP-I. Células HeLa foram tratadas apenas com meio de cultura (grupo controle). A viabilidade celular foi expressa em porcentagem (viabilidade celular %), sendo a absorbância das células incubadas apenas com meio de cultura considerada 100% de viabilidade. Os dados são expressos como média $\pm$ desvio padrão de experimentos realizados em triplicata. Diferenças significativas detectadas pelo teste de Kruskal-Wallis e pós-teste de comparações múltiplas de Dunn são rotuladas (estatisticamente significativas quando  $P < 0,05$ )

#### 4.2 BpMP-I é capaz de reduzir a proliferação intracelular de *T. gondii* em células HeLa

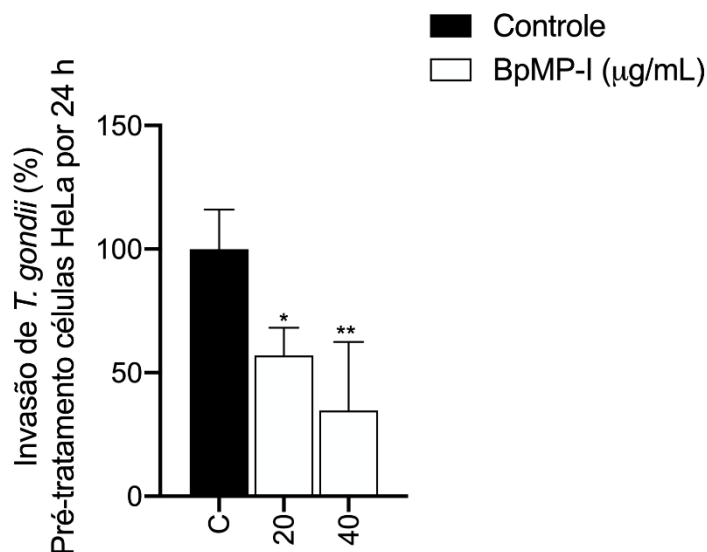
O tratamento de células HeLa (infectadas) com BpMP-I (20 e 40  $\mu\text{g/mL}$ ), doses que não foram citotóxicas para as células, foi capaz de controlar significativamente a proliferação de *T. gondii* após 24 h em comparação com células não tratadas, conforme avaliado pela medição da atividade da enzima  $\beta$ -galactosidase ( $P < 0,05$ ; Fig. 3).



**Figura 3.** Avaliação da proliferação intracelular de *T. gondii* pela atividade da enzima  $\beta$ -galactosidase. Células HeLa infectadas com *T. gondii* foram tratadas por 24 h com concentrações não tóxicas de 20 e 40  $\mu\text{g/mL}$ . As células HeLa foram tratadas apenas com meio de cultura (grupo controle considerado como 100% de proliferação parasitária). A proliferação intracelular de *T. gondii* foi analisada usando um ensaio colorimétrico de  $\beta$ -galactosidase e expressa em variação percentual em relação ao controle (% de proliferação de *T. gondii*). Os resultados estão apresentados como média $\pm$ desvio padrão de experimentos realizados em triplicata. \*Comparação entre células infectadas/não tratadas e células infectadas/tratadas. Diferenças significativas foram determinadas por One-Way ANOVA e o pós-teste de comparações múltiplas de Turkey para avaliar diferenças significativas ( $P < 0,05$ ).

### 4.3 BpMP-I reduz a susceptibilidade de células HeLa frente a infecção experimental por *T. gondii*

Para analisar os efeitos da BpMP-I na susceptibilidade da infecção, células HeLa foram pré-tratadas por 24 h com BpMP-I antes da invasão/infecção. Quando as células HeLa foram pré-tratadas com as concentrações de 20 e 40  $\mu\text{g/mL}$  de BpMP-I, foi observado que a invasão desses parasitos foi significativamente reduzida em comparação com células não pré-tratadas ( $P < 0,05$ ; Fig. 4).



**Figura 4.** Invasão de taquizoítos de *T. gondii* em células HeLa pré-tratadas. Células HeLa foram pré-incubadas por 24 h com 20 e 40 µg/mL de BpMP-I ou meio de cultura sozinho (grupo controle/grupo não tratado). A % de invasão de *T. gondii* após 3 h foi determinada usando o ensaio de β-galactosidase. Parasitos não tratados (grupo controle) foram considerados como 100% de invasão. Os dados são expressos como média±desvio padrão de experimentos realizados em triplicatas. \*Comparação entre parasitos não tratados e parasitos tratados. Diferenças significativas foram analisadas usando One-Way ANOVA e o pós-teste de comparações múltiplas de Turkey. As diferenças foram consideradas significativas quando  $P < 0,05$ .

#### 4.4 O tratamento com BpMP-I aumenta a liberação das citocinas IL-6, IL-8 e MIF em células HeLa infectadas por *T. gondii*

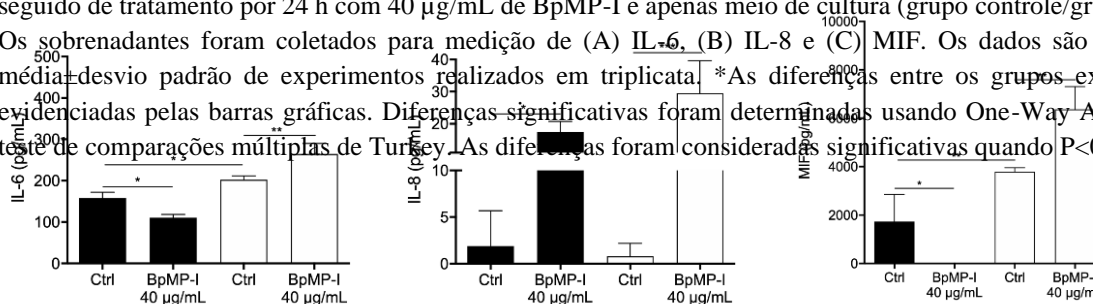
No presente trabalho, também realizamos testes para determinar o perfil de citocinas potencialmente envolvidas no controle da proliferação intracelular do parasito em células HeLa.

Na ausência de infecção, observamos que o tratamento por 24 h com BpMP-I foi capaz de promover uma redução significativa dos níveis de IL-6 e MIF, quando comparado com o grupo não infectado/não tratado; por outro lado, a toxina causou uma regulação positiva na liberação de IL-8 em comparação com o grupo não infectado e incubado apenas com meio de cultura ( $P < 0.05$ ; Fig. 5A, B e C).

Também observamos que a infecção por *T. gondii* aumentou a produção de IL-6 e MIF em comparação com o respectivo grupo tratado/não infectado ( $P < 0,05$ ; Fig. 5A e C). Semelhantemente, nossos dados demonstraram que BpMP-I foi capaz de

modular positivamente a produção de IL-6, IL-8 e MIF em células HeLa infectadas, quando comparado com o grupo infectado/ não tratado (controle) ( $P < 0,05$ ; Fig. 5A, B e C).

**Figura 5.** Produção de citocinas por células HeLa. Células HeLa foram infectadas ou não com taquizoítos de *T. gondii* e seguidas de tratamento por 24 h com 40  $\mu\text{g/mL}$  de BpMP-I e apenas meio de cultura (grupo controle/grupo não tratado). Os sobrenadantes foram coletados para medição de (A) IL-6, (B) IL-8 e (C) MIF. Os dados são expressos como média  $\pm$  desvio padrão de experimentos realizados em triplicata. \*As diferenças entre os grupos experimentais são evidenciadas pelas barras gráficas. Diferenças significativas foram determinadas usando One-Way ANOVA e o pós-teste de comparações múltiplas de Tukey. As diferenças foram consideradas significativas quando  $P < 0,05$ .

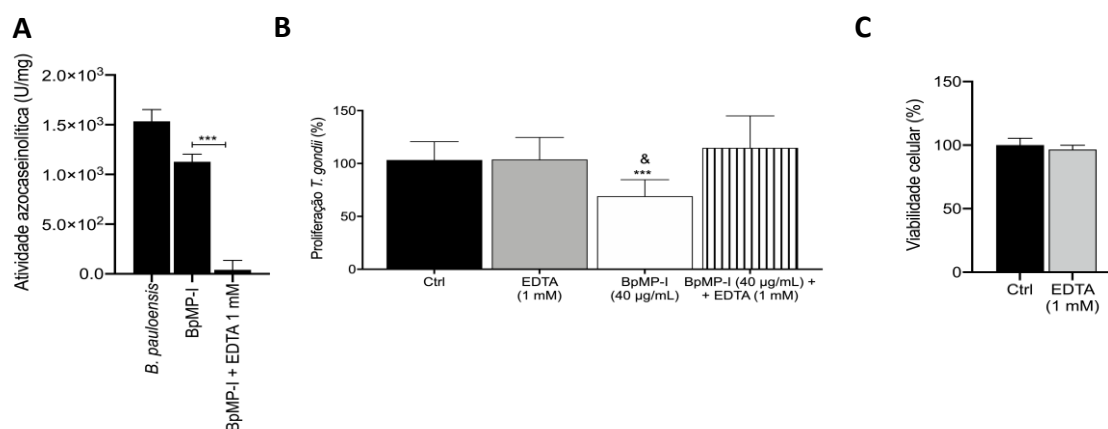


#### 4.5 O controle do parasitismo mediado por BpMP-I depende de sua atividade catalítica

Inicialmente, promovemos e confirmamos a inativação da atividade enzimática da BpMP-I por meio da incubação com EDTA, e posterior avaliação de sua ação sobre o substrato da azocaseína. A peçonha bruta de *B. pauloensis* e a BpMP-I apresentaram atividade sobre azocaseína, contudo, quando a toxina é incubada com EDTA 1mM, há uma redução drástica de sua atividade, mostrando assim que, esta concentração de EDTA é capaz de inibir a atividade catalítica da BpMP-I ( $P < 0,05$ ; Fig. 6A).

No ensaio proliferação intracelular de *T. gondii*, observamos que a inativação da atividade catalítica da BpMP-I com EDTA, resulta na perda da capacidade desta toxina em controlar o parasitismo, quando comparado com as células incubadas com meio de cultura (controle) ou tratadas apenas com EDTA (1 mM) ( $P < 0,05$ ; Fig. 6B), mostrando que o controle do parasitismo mediado pela BpMP-I possivelmente é dependente do seu sítio catalítico, pois quando se encontra inibido, a toxina perde a

capacidade de controlar a proliferação intracelular do parasito. Por fim, verificamos que a concentração de 1 mM de EDTA não apresentou toxicidade às células HeLa após 24 h de tratamento em comparação com o controle não tratado ( $P < 0,05$ ; Fig. 6C).



**Figura 6.** A atividade catalítica/proteolítica da BpMP-I sobre a azocaseína (1mg/mL). (A) Avaliação da atividade catalítica da BpMP-I na ausência ou presença de EDTA (1mM). (B) Avaliação da proliferação intracelular de *T. gondii* após 24 h de tratamento. A proliferação intracelular de *T. gondii* foi analisada usando um ensaio colorimétrico de  $\beta$ -galactosidase e expressa em variação percentual em relação ao controle (% de proliferação de *T. gondii*) (C) Ensaio de viabilidade de células HeLa tratadas por 24 h com EDTA (1mM). Os dados são expressos como média $\pm$ desvio padrão de experimentos realizados em triplicatas. \*\*\*As diferenças entre os grupos experimentais são evidenciadas pelas barras gráficas e/ou em relação ao grupo controle. &Comparação em relação ao grupo tratado com EDTA (1mM). Diferenças significativas foram determinadas usando One-Way ANOVA e o pós-teste de comparações múltiplas de Turkey. As diferenças foram consideradas significativas quando  $P < 0,05$ .

## 5.0 Discussão

No presente estudo, BpMP-I, uma SVMP da classe PI isolada da peçonha de *B. pauloensis*, mostrou efeitos consideráveis de inibição da infecção por *T. gondii* em modelo *in vitro* por meio do uso de células HeLa. Inicialmente, nosso trabalho demonstrou que concentrações não citotóxicas de BpMP-I (20 e 40  $\mu$ g/mL) foram capazes de inibir significativamente a proliferação intracelular do parasito. De acordo com a literatura, a replicação de taquizoítos de *T. gondii* no interior das células ocorre em um período de 6 a 8 horas até que as células hospedeiras sejam lisadas, e os



taquizoítos liberados infectem as células adjacentes (BLACK e BOOTHROYD, 2000). Acreditamos que a BpMP-I presente no meio de cultura e em contato com as células infectadas, consiga agir diretamente sobre os taquizoítos extracelulares oriundos das células lisadas, promovendo a degradação de componentes essenciais à invasão do parasito.

*T. gondii* expressa pelo menos cinco proteínas transmembranas (CARRUTHERS e BOOTHROYD, 2007) e uma família de proteínas relacionadas a antígenos de superfície (SAGs), que constituem a maioria dos componentes de superfície desse protozoário (BLACK e BOOTHROYD, 2000). Dentre essas proteínas, a SAG1 é a que se apresenta em maior abundância, e está envolvida no processo de invasão da célula hospedeira atuando como um importante receptor do parasita (MINEO e KASPER, 1994). Os taquizoítos apresentam organelas que secretam proteínas as quais desempenham papel central na função de mobilidade e invasão (CARRUTHERS, 2006). Todas essas proteínas comentadas podem ser alvo da atividade proteolítica da BpMP-I. Quando as células são tratadas com a toxina, pode ser que ocorra a perda da função dessas proteínas, de forma que reduza a infecção *in vitro* por *T. gondii*, esse seria um dos prováveis mecanismos de ação da BpMP-I, contudo mais ensaios são necessários para melhor compreensão deste mecanismo.

Após infectar a célula hospedeira, os taquizoítos de *T. gondii* são envolvidos em um vacúolo parasitóforo, constituído principalmente por material membranoso proveniente do parasito (DUBEY et al., 1998; BLACK e BOOTHROYD, 2000). Durante o processo de endodiogenia, o plasmalema original dos taquizoítos invasores é usado para envolver as células filhas geradas. Hipotetizamos também que quando as células infectadas são tratadas com BpMP-I, a membrana do parasito possa ser submetida à ação proteolítica desta enzima. Como resultado, a membrana pode perder a integridade de algumas proteínas, o que pode prejudicar a atividade funcional do vacúolo tanto quanto a formação do plasmalema das células filhas, reduzindo a replicação intracelular de *T. gondii*.

Em relação a invasão do parasita na célula, o pré-tratamento das células com BpMP-I (20 e 40 µg/mL) por 24 horas antes da infecção por *T. gondii* foi eficaz, apresentando uma inibição significativa da invasão. Aparentemente a BpMP-I atua quando o parasito irá invadir a célula, pois a toxina pode atuar degradando as

proteínas expressas pelas células hospedeiras (célula HeLa), que são responsáveis pela formação da monocamada e adesão das células (BLACK e BOOTHROYD, 2000).

Como glicoproteína de maior abundância nas membranas basais de células epiteliais, temos a laminina, que promove adesão célula-célula, migração e diferenciação celular através de sua interação com moléculas da superfície celular e seus receptores (FURTADO et al., 1992a). Nesse contexto, a literatura traz que *T. gondii* é capaz de se aderir à membrana da célula hospedeira por meio de laminina, expressa pelo próprio patógeno, a qual é reconhecida pelo receptor de laminina  $\alpha 6\beta 1$  da célula hospedeira (FURTADO et al., 1992b). Além disso, *T. gondii* é capaz de se ligar à laminina da célula hospedeira e usá-la como ponte para os receptores de laminina encontrados na superfície da célula hospedeira (BLACK e BOOTHROYD, 2000), uma vez que os taquizoítos reconhecem múltiplos receptores de laminina durante a adesão a diferentes células-alvo (FURTADO et al., 1992a).

Assim, sugerimos que BpMP-I podem degradar proteínas expressas na lâmina basal das células HeLa, responsáveis por manter a adesão da monocamada celular, principalmente a laminina, que está envolvida no processo de invasão do parasito. Corroborando nossa hipótese, foi demonstrado que a neuwiedase, uma SVMP de classe P-I isolada da peçonha de *Bothrops neuwiedi*, é capaz de degradar alguns componentes da matriz extracelular, como laminina, colágeno tipo I e fibronectina (RODRIGUES et al., 2001). Além disso, foi reportado que Jararagina, uma SVMP de classe P-III isolada da peçonha de *B. jararaca*, se liga a laminina (BALDO et al., 2015), o que reduz a disponibilização desta proteína na extremidade das células (COSTA et al., 2004). Por fim, em consonância com nossa hipótese, demonstramos a importância da atividade catalítica de BpMP-I no controle da infecção, uma vez que quando inibida por EDTA, a toxina perdeu sua capacidade de controlar o parasitismo. Contudo, para termos certeza se de fato o sítio enzimático da SVMP é essencial ou não para sua atividade antiparasitária, pretendemos realizar em ensaios futuros, testes com outros inibidores enzimáticos, bem como com outras classes de SVMP.

Já tem descrito na literatura que a passagem de várias membranas basais e infiltração na matriz extracelular pelo *T. gondii* poderia envolver metaloproteases de

matriz de células hospedeiras (BUACHE et al., 2007). Também já se encontra descrito na literatura a presença de metaloprotease endógenas de *T. gondii* (BERTHONNEAU et al., 2000; SONG e NAM, 2003), porém ainda não foi elucidado seu real papel mediante as células hospedeiras, tornando necessário mais pesquisas envolvendo esses processos bioquímicos, se há interação com metaloproteases endógena de *T. gondii* esclarecer sua interação com a BpMP-I ou outras metaloproteases. E determinar sobre quais proteínas de superfície do parasito a toxina possa atuar.

Além de sua possível ação catalítica direta sobre os parasitos e/ou em componentes proteicos da célula hospedeira, uma hipótese adicional, mas não exclusiva, é que BpMP-I possa atuar modulando a expressão de mediadores da resposta imune, o que poderia levar ao controle da infecção por *T. gondii*. Com relação aos ensaios de dosagem de citocinas em sobrenadantes de células HeLa infectados por *T. gondii*, observamos, em linhas gerais, que o tratamento com BpMP-I (40 µg/mL) aumentou a expressão das citocinas IL-6, IL-8 e MIF nas células infectadas.

De acordo com estudos descritos na literatura, altos níveis de IL-6 e MIF são capazes de reduzir o crescimento de *T. gondii* em diferentes modelos experimentais (FERRO et al., 2008; FLORES et al., 2008; CASTRO et al., 2013; CASTRO-FILICE et al., 2014). Alguns mecanismos das ações de MIF e IL-6 podem ser hipotetizados para explicar como essas citocinas podem controlar a infecção por *T. gondii* (CASTRO et al., 2013).

O MIF também é responsável pela regulação positiva de alguns receptores e ativação de fatores de transcrição importantes na mediação da imunidade inata contra patógenos (ROGER, T. et al., 2001). Além disso, o MIF pode ativar fatores de transcrição envolvidos na expressão de muitas citocinas pró-inflamatórias, via de sinalização relacionadas na defesa de várias infecções (KOEBERNICK H., et al., 2002). A IL-6, por sua vez, induz a expressão deIDO (indoleamina 2,3 dioxigenase) através da via JAK/STAT. Como a IDO é uma enzima responsável pela degradação do triptofano, que é um aminoácido essencial para a proliferação do *T. gondii*, a IL-6 pode controlar o crescimento do patógeno devido à regulação positiva de IDO (KIM H, et al., 2012).

Similarmente ao que foi demonstrado neste trabalho, a SVMP P-I neuwiedase também promoveu uma modulação positiva na produção de IL-8 pelos fibroblastos

humanos HFF infectados por *T. gondii* (BASTOS et al., 2008). Os autores sugerem que por ser um potente agente quimiotático, a IL-8 pode atrair neutrófilos e leucócitos sob ação de diferentes estímulos (HAYASHI et al., 2003). Assim, a liberação de IL-8 por células infectadas por *T. gondii* sob tratamento com BpMP-I pode ser decorrente de uma tentativa de recrutamento de células efetoras do sistema imune para controle do parasitismo. Entretanto, é importante destacar que *T. gondii* pode vir a fazer uso destas células recrutadas como uma via de disseminação da infecção *in vivo* (ÓLAFSSON et al., 2019). Por essa razão, o papel de IL-8 na infecção por *T. gondii* ainda não se encontra totalmente esclarecido.

Tomados em conjunto, novos estudos estruturais e funcionais com a BpMP-I, bem como com outras SVMPs são essenciais para descobrir novos sítios proteicos relevantes responsáveis pelas atividades anti-*T. gondii* que possam permitir o uso futuro dessas proteínas como modelos estruturais para o desenho de antiparasitários, capazes de garantir maior estabilidade e direcionar o local de ação específico.

## 6.0 Referências bibliográficas

ACHÊ, D. C., et al. Análise bioquímica e funcional de uma metaloprotease PI (BpMPII) isolada da peçonha de *Bothrops pauloensis*, 2013.

ACHÊ, D. C., GOMES, M. S., DE SOUZA, D. L., SILVA, M. A., BRANDEBURGO, M. I., YONEYAMA, K. A., RODRIGUES, R. S., BORGES, M. H., LOPES, D. S., & RODRIGUES, V.de M. (2015). Biochemical properties of a new PI SVMP from *Bothrops pauloensis*: inhibition of cell adhesion and angiogenesis. *International journal of biological macromolecules*, 72, 445–453. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.08.050>

ALDAY, P. H.; DOGGETT. J. S. Drugs development for toxoplasmosis: advances, challenges, and current status. *Drug Design, Development and Therapy*. [s. l.], v. 11, p. 273-293, 2017.

AZEVEDO, F. V. P. D. V.; LOPES, D. S.; ZÓIA, M. A. P. ; CORREIA, L. I. V. ; SAITO, N. ; FONSECA, B. B. ; POLLONI, L. ; TEIXEIRA, S. C. ; GOULART, L. R. ; RODRIGUES , V. D. M. . A New Approach to Inhibiting Triple-Negative Breast Cancer: In Vitro, Ex Vivo and In Vivo Antiangiogenic Effect of BthTx-II, a PLA2-Asp-49 from *Bothrops jararacussu* Venom. **BIOMOLECULES**, v. 12, p. 258, 2022.

AZEVEDO, F. V. P. D. V.; ZÓIA, M. A. P.; LOPES, D. S.; GIMENES, S. N.; VECCHI, L.; ALVES, P. T. ; RODRIGUES, R. S. ; SILVA, A. C. A. ; YONEYAMA, K. A. G. ; GOULART, L. R. ; RODRIGUES, V. D. M. . Antitumor and antimetastatic effects of PLA2-BthTX-II from *Bothrops jararacussu* venom on human breast cancer cells. **INTERNATIONAL JOURNAL OF BIOLOGICAL MACROMOLECULES**, v. 135, p. 261-273, 2019.

BALDO C. a, LOPES D.S. b, FAQUIM-MAURO E.L.a, JACYSYN J.F. c, NILAND S.d, EBLE J.A.d, P.B. CLISSA a, A.M. MOURA-DA-SILVA a, Jararhagin disruption of

endothelial cell anchorage is enhanced in collagen enriched matrices. **toxicon**.2015, 240e248

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 interferon-gamma, interleukin-10 and transforming growth factor-beta1. *Clin Exp Immunol* 151, 536-545.

BARBOSA, L. G.; COSTA, T. R.; BORGES, I. P.; COSTA, M. S.; CARNEIRO, A. C.; BORGES, B. C.; SILVA, M. J. B.; AMORIM, F. G.; QUINTON, L.; YONEYAMA, K. A. G.; RODRIGUES, V. D. M.; SAMPAIO, S. V.; RODRIGUES, R. S.. A comparative study on the leishmanicidal activity of the L-amino acid oxidases BjuSSuLAAO-II and BmooLAAO-II isolated from Brazilian Bothrops snake venoms. **INTERNATIONAL JOURNAL OF BIOLOGICAL MACROMOLECULES**, v. 167, p. 267-278, 2021.

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

BELÁ, S. R. Avaliação do antígeno SAG2A recombinante de *Toxoplasma gondii* como um potencial marcador diagnóstico para toxoplasmose humana aguda. Uberlândia, 2007. p. 92. Dissertação (Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas). Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Uberlândia.

BERTHONNEAU, J., RODIER, M.H., EL MOUDNI, B., JACQUEMIN, J.L., 2000. *Toxoplasma gondii*: purification and characterization of an immunogenic metallopeptidase. *Experimental Parasitology* 95, 158–162.

BLACK, M.W., BOOTHROYD, J.C., 2000. Lytic cycle of *Toxoplasma gondii*. **Microbiology and Molecular Biology Reviews** 64, 607–623

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.

BORGES, I. P. et al; Efeito antiparasitário sobre *Toxoplasma gondii* induzido pela BNSP-7, uma PLA2-LYS49 homóloga da peçonha de *Bothrops pauloensis*, 2016.

Brasil. Ministério da Saúde. *Gestação de alto risco: manual técnico*. 5a ed. Brasília: Ministério da Saúde; 2010.

BUACHE, E., GARNOTEL, R., AUBERT, D., GILLERY, P., VILLENA, I., 2007. Reduced secretion and expression of gelatinase profile in *Toxoplasma gondii*-infected human monocytic cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 359, 298–303.

CALDERON, L. A.; SOBRINHO, J. C.; ZAQUEO, K. D.; DE MOURA, A. A.; GRABNER, A. N.; MAZZI, M. V.; MARCUSSI, S.; NOMIZO, A.; FERNANDES, C. F.; ZULIANI, J. P. Antitumoral activity of snake venom proteins: new trends in cancer therapy. **BioMed Research International**, v. 2014, 2014.

Calero-Bernal R, Gennari SM. Clinical toxoplasmosis in dogs and cats: an update. *Front Vet Sci*. 2019;6:54. doi: 10.3389/fvets.2019.00054

CAPOBIANGO, J. D. et al. Congenital toxoplasmosis in a reference center of Paraná, Southern Brazil. *Braz. J. Infect. Dis.*, v. 18, n. 4, p. 364-371, 2014.

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

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

CARLSON, B.; ROURK, M. J.; DESAI, H. E. C. **Analgesics Based on Snake Venoms**: Google Patents 2014

CASTRO, A. S. et al. Trophoblast cells can regulate monocyte activity to control *Toxoplasma gondii* infection. *Placenta* 34, 240–247. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2012.12.006> (2013).

CASTRO-FILICE, L. S. et al. Azithromycin is able to control *Toxoplasma gondii* infection in human villous explants. *J. Transl. Med.* 12, 132. <https://doi.org/10.1186/1479-5876-12-132> (2014).

CASEWELL, N.; SUNAGAR, K.; TAKACS, Z.; CALVETE, J.; JACKSON, T.; FRY, B. Snake venom metalloprotease enzymes. **Venomous Reptiles and Their Toxins: Evolution, Pathophysiology and Biodiscovery.**, Fry, BG, Ed, p. 347-363, 2015.

CHELLAPANDI, P. Structural, functional and therapeutic aspects of snake venom metalloproteinases. **Mini-Reviews in Organic Chemistry**, v. 11, n. 1, p. 28-44, 2014.

CHERWINSKI, H.M.; SCHUMACHER, J.H.; BROWN, K.D.; MOSMANN, T.R. Two types mouse helper T cell clone. III. Further differences in lymphokine synthesis between Th1 and Th2 clones revealed by RNA hybridization, v.166, p. 1229-44, 1987.

COSTA, E. P., SANTOS, M.F. Jararhagin, a snake venom metalloproteinase-disintegrin, stimulates epithelial cell migration in an in vitro restitution model. **Toxicon** 44 (2004) 861–870 doi:10.1016/j.toxicon.2004.08.009

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 PAULA, F. F. P.; RIBEIRO, J. U.; SANTOS, L. M.; DE SOUZA, D. H. F.; LEONARDECZ, E.; HENRIQUE-SILVA, F.; SELISTRE-DE-ARAUJO, H. S.. Molecular characterization of metalloproteases from *Bothrops alternatus* snake venom. *Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics*, v. 12, n. 0, p. 74-83, 2014.

DE SOUZA, W., and BELFORT JR., R., comp. *Toxoplasmose & Toxoplasma gondii* [online]. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2014.

DEBIERRE-GROCKIEGO, F. Glycolipids are potential targets for protozoan parasite diseases. *Trends in Parasitology*, v. 26, n. 8, p. 404-411, 2010.

DOLIWA, C. et al. Sulfadiazine resistance in *Toxoplasma gondii*: no involvement of overexpression or polymorphisms in genes of therapeutic targets and ABC transporters. *Parasite (Paris, France)* 20, 19. <https://doi.org/10.1051/parasite/2013020> (2013).

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

DUBEY, J. Advances in the life cycle of *Toxoplasma gondii*. *International Journal For Parasitology*, v. 28, n. 7, p. 1019-1024, 1998.

FERGUSON, D. J. *Toxoplasma gondii*: 1908-2008, homage to Nicolle, Manceaux and Splendore. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 104: 133-148, 2009

FERRO, E. A. et al. Macrophage migration inhibitory factor is up-regulated in human first-trimester placenta stimulated by soluble antigen of *Toxoplasma gondii*, resulting in increased monocyte adhesion on villous explants. *Am. J. Pathol.* 172, 50–58. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2008.07043> 2 (2008).

FLORES, M. et al. Macrophage migration inhibitory factor (MIF) is critical for the host resistance against *Toxoplasma gondii*. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 22, 3661–3671. <https://doi.org/10.1096/fj.08-111666> (2008).

FOX, J. W.; SERRANO, S. M. Exploring snake venom proteomes: multifaceted analyses for complex toxin mixtures. *Proteomics*, v. 8, n. 4, p. 909-920, 2008.

FURTADO, G.C., SLOWIK, M., KLEINMAN, H.K., JOINER, K.A., 1992a. Laminin enhances binding of *Toxoplasma gondii* tachyzoites to J774 murine macrophage cells. *Infection and Immunity* 6, 2337–2342.

FURTADO, G.C., CAO, Y., JOINER, K.A., 1992b. Laminin on *Toxoplasma gondii* mediates parasite binding to the  $\beta 1$  integrin receptor  $\alpha 6 \beta 1$  on human foreskin fibroblasts and Chinese hamster ovary cells. *Infection and Immunity* 11, 4925–4931.

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.

GAZZINELLI, R. T.; MENDONCA-NETO, R.; LILUE, J.; HOWARD, J.; SHER, A. Innate resistance against *Toxoplasma gondii*: an evolutionary tale of mice, cats, and men. *Cell Host & Microbe*, v. 15, n. 2, p. 132-138, 2014.

GOMES et al., 2015  
<https://academic.oup.com/jb/article/157/3/137/2726260?login=true>

GOMIS-RÜTH, F.X., BOTELHO, T.O., AND BODE, W. A standard orientation for metallopeptidases. *Biochim. Biophys. Acta* 1824, 157 - 163; 2012.

GOMIS-RÜTH, F.X. Structural aspects of the *metzincin* clan of metalloendopeptidases. **Mol. Biotechnol.** 24, 157 - 202; 2003.

GUIMARÃES, D. D. O.; LOPES, D. S. ; AZEVEDO, F. V. P. V. ; GIMENES, S. N. C. ; S., MAKSWELL A.; Achê, D. C. ; GOMES, M. S. R. ; VECCHI, L. ; GOULART, L. R. ; YONEYAMA, K. A.G.; RODRIGUES, R. S. ; Rodrigues, V. d. M. . In vitro antitumor and antiangiogenic effects of Bothropoidin, a metalloproteinase from *Bothrops pauloensis* snake venom. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 97, p. 770-777, 2017.

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

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

HAYASHI, F., MEANS, T.K., LUSTER, A.D., 2003. Toll-like receptors stimulate human neutrophil function. *Blood* 102, 2660–2669.

IZIDORO, L. F. M. et al. *Bothrops pirajai* snake venom L-amino acid oxidase: in vitro effects on infection of *Toxoplasma gondii* in human foreskin fibroblasts *Revista Brasileira de Farmacognosia Brazilian Journal of Pharmacognosy* 21(3): 477-485, May./Jun. 2011

KIM, H; CHEN, L.; LIN G; SUNG, B.; WANG, S.; MCCABE MF, et al. Brain indoleamine 2,3-dioxygenase contributes to the comorbidity of pain and depression. *J Clin Invest* 2012; 122:2940e54.

KOEBERNICK, H.; GRODE, L.; DAVID, JR.; ROHDE, W.; ROLPH, MS.; MITTRÜCKER, HW.; et al., Macrophage migration inhibitory factor (MIF) plays a pivotal role in immunity against *Salmonella typhimurium*. Proc Natl Acad Sci U S A 2002; 99:13681e6).

LANG, C.; GROSS, U. & LÜDER, C. G. Subversion of innate and adaptive immune responses by *Toxoplasma gondii*. Parasitology Research, 100: 191-203, 2007.

LEVINE, N. D. The Protozoan Phylum Apicomplexa. Boca Raton: CRC Press, 1988. 2v

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.

MARKLAND JR, F. S.; SWENSON, S.. Snake venom metalloproteinases. Toxicon, v. 62, p. 3-18, 2013.

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.

MINEO, J.R., KASPER, L.H., 1994. Attachment of *Toxoplasma gondii* to host cells. involves major surface protein, SAG1 (P30). Experimental Parasitology 79, 11–20.

MONTOYA, J. G.; LIESENFELD, O. Toxoplasmosis. Lancet, v. 363, n. 9425, p. 1965-1976, 2004.

MONTOYA, J. G.; REMINGTON, J. S. Management of *Toxoplasma gondii* infection during pregnancy. **Clin infect dis.**, v. 47, n. 4, p. 554–566, 2008.

NAVES, D.I.S.; GOMES, M.S.R.; FERREIRA, F.B.; RODRIGUES, R.S., ACHÊ, D.C., RICHARDSON, M.; BORGES, M.H.; RODRIGUE, V.M. Biochemical and enzymatic characterization of BpMP-I, a fibrinogenolytic metalloproteinase isolated from *Bothropoides pauloensis* snake venom. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part B 161, 102-109, 2012.

OLAOPA, O. T., KARINA DOS SANTOS, P., SELISTRE-DE-ARAUJO, H. S., & FERREIRA DE SOUZA, D. H. (2020). Snake Venom Metalloproteinases (SVMPs): A structure-function update. **Toxicon**: X, 7, 100052. <https://doi.org/10.1016/j.toxcx.2020.100052>

ÓLAFSSON, E. B.; ROSS, E. C.; VARAS-GODOY, M.; BARRAGAN A.. TIMP-1 promotes hypermigration of Toxoplasma-infected primary dendritic cells via CD63–ITGB1–FAK signaling in collection: Cell Migration. *J Cell Sci* (2019) 132 (3): jcs225193. <https://doi.org/10.1242/jcs.225193>

POLLONI, L.; AZEVEDO, F. V. P. V.; TEIXEIRA, S. C.; MOURA, E.; COSTA, T. R.; GIMENES, S. N. C.; CORREIA, L. I. V.; FREITAS, V.; YONEYAMA, K. A. G.; RODRIGUES, R. S.; LOPES, D. S.; RODRIGUES, V. D. M.. Antiangiogenic effects of phospholipase A2 Lys49 BnSP-7 from *Bothrops pauloensis* snake venom on endothelial cells: An in vitro and ex vivo approach. **TOXICOLOGY IN VITRO**, v. 72, p. 105099, 2021.

PRADO, A. A. F.; ALMEIDA, G. F.; GONTIJO, L. S.; TORRES, M. L. M. Toxoplasmose: O que o profissional da saúde deve saber. *Enciclopédia Biosfera*. Goiânia, v. 7, n. 12, p. 1-30, 2011.

RODRIGUES, R.S.; BOLDRINI-FRANÇA, J.; FONSECA, F.P.P.; DE LA TORRE, P.; HENRIQUE-SILVA, F.; SANZ, L.; CALVETE, J.J.; RODRIGUES, V.M. Combined snake venomomics and venom gland transcriptomic analysis of *Bothropoides pauloensis*. **Journal of Proteomics**, v. 75, p. 2707- 2720, 2012.

RODRIGUES, V. D.; HAMAGUCHI, A.; FERRO, E. A. V. ; HOMSIBRANDEBURGO, M. I. ; GIGLIO, J. R. ; MARCUSSI, S. ; SILVEIRA, L. B. ; SOARES, A. M. . Bactericidal and neurotoxic activities of two myotoxic phospholipases A2 from *Bothrops neuwiedi pauloensis* snake venom. *Toxicon*, **Toxicon**, v. 44, p. 305-314, 2004.

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

ROBERT-GANGNEUX, F.; STERKERS, Y.; YERA, H.; ACCOCEBERRY, I.; MENOTTI, J.; CASSAING, S.; BRENIER-PINCHART, M. P.; HENNEQUIN, C.; DELHAES, L.; BONHOMME, J.; VILLENA, I.; SCHERER, E.; DALLE, F.; TOUAFEK, F.; FILISETTI, D.; VARLET-MARIE, E.; PELLOUX, H.; BASTIEN, P. Molecular diagnosis of toxoplasmosis in immunocompromised patients: a 3-year multicenter retrospective study. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 53, n. 5, p. 1677-1684, 2015.

ROBERT-GANGNEUX, F.; DARDÉ, L. M. Epidemiology of and diagnostic strategies for Toxoplasmosis. *Cl. Microbiol. Rev.*, v. 25, n. 2, p. 264-296, 2012.

ROGER T, DAVID J, GLAUSER MP, CALANDRA T. MIF regulates innate immune responses through modulation of Toll-like receptor 4. *Nature*. 2001 Dec 20-27;414(6866):920-4. doi: 10.1038/414920a. PMID: 11780066.

ROUGIER, S.; MONTROYA, J. G.; PEYRON, F. Lifelong persistence of *Toxoplasma* cysts: A questionable dogma? *Trends in Parasitology*, 2016.

SANFELICE, R. A. et al. Pravastatin and simvastatin pretreatment in combination with pyrimethamine and sulfadiazine reduces infection process of *Toxoplasma gondii* (RH strain) in HeLa cells. *Acta Parasitol.*, v. 64, n. 3, p. 612-616, 2019.

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.

SILVA, LETÍCIA AZEVEDO *et al*, Genetic Polymorphisms and Phenotypic Profiles of Sulfadiazine-Resistant and Sensitive *Toxoplasma gondii* Isolates Obtained from Newborns with Congenital Toxoplasmosis in Minas Gerais, Brazil, **PLOS ONE**, v. 12, n. 1, p. e0170689, 2017.

SILVEIRA, C. et al. Ocular involvement following an epidemic of *Toxoplasma gondii* infection in Santa Isabel do Ivaí, Brazil. *Am. J. Ophthalmol.*, v. 159, n. 6, p. 1013-1021, 2015.

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

SONG, K.J., NAM, H.W., 2003. Protease activity of 80 kDa protein secreted from the apicomplexan parasite *Toxoplasma gondii*. **Korean Journal of Parasitology** 41, 165–169.

SOUZA J. R. F.; MONTEIRO R. Q.; CASTRO H. C.; ZINGALI R. B. Proteolytic action of *Bothrops jararaca* venom upon its own constituents, **Toxicon**, v. 39, p 787-792, 2001.

SOUZA, W. Aspectos Bioquímicos. In: SOUZA, W., e BELFORT JR., R. (org). comp. *Toxoplasmose & Toxoplasma gondii*. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2014. p.61-67

SPEER, C. A. & DUBEY, J. P. Ultrastructural differentiation of *Toxoplasma gondii* schizonts (types B to E) and gamonts in the intestines of cats fed bradyzoites. *International Journal for Parasitology*, 35: 193-206, 2005.

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

TAKEDA, S., TAKEYA, H., IWANAGA, S., 2012. Snake venom metalloproteinases: structure, function and relevance to the mammalian ADAM/ADAMTS family proteins. *Biochim. Biophys. Acta Protein Proteomics* 1824, 164–176. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2011.04.009>

TEIXEIRA, S.C. ; BORGES, B.C. ; OLIVEIRA, V.Q. ; CARREGOSA, L.S. ; BASTOS, L.A. ; SANTOS, I.A. ; JARDIM, A.C.G. ; FREIRE, F.M. ; MARTINS, L. ; **RODRIGUES, V.M.** ; LOPES, D.S. . Insights into the antiviral activity of phospholipases A2 (PLA2s) from snake venoms. *INTERNATIONAL JOURNAL OF BIOLOGICAL MACROMOLECULES*, v. 164, p. 616-625, 2020

TEIXEIRA, S. C.; DA SILVA, M. S.; GOMES, A. A. S.; MORETTI, N. S.; LOPES, D. S.; Ferro, E. A. V.; Rodrigues, V. d. M.. Panacea within a Pandora's box: the antiparasitic effects of phospholipases A2 (PLA2s) from snake venoms. **TRENDS IN PARASITOLOGY**, v. 2160, p. 1-15, 2021.

TENTER, A. M.; HECKEROTH, A. R. & WEISS, L. M. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *International Journal for Parasitology*, 30: 1.217-1.258, 2000.

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.

ZELANIS, A. et al. Analysis of the Ontogenetic Variation in the Venom Proteome / Peptidome of Bothrops jararaca Reveals Different Strategies to Deal with Prey. **Journal of Proteome Research**, v. 9, p. 2278–2291, 2010.