



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS – ICBIM

CURSO DE BIOMEDICINA



Análise in silico e in vitro da interação da BthTX-I, uma PLA₂ Lys-49 da peçonha de Bothrops jararacussu, com proteínas-alvo associadas à infecção por Toxoplasma gondii

Leonardo Alves Garcia

Monografia apresentada à Coordenação do Curso de Biomedicina, da Universidade Federal de Uberlândia, para obtenção do grau de Bacharel em Biomedicina.

Uberlândia

2025

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS – ICBIM
CURSO DE BIOMEDICINA

*Análise in silico da interação da BthTX-I, uma PLA₂ Lys-49 da
peçonha de Bothrops jararacussu, com proteínas-alvo associadas
à infecção por Toxoplasma gondii*

Leonardo Alves Garcia

Autor

Prof^a Dr^a. Veridiana de Melo Rodrigues Ávila

Orientadora

Instituto de Biotecnologia - IBTEC

Msc. Vinícius Queiroz Oliveira

Co-orientador

Instituto de Biotecnologia - IBTEC

Monografia apresentada à Coordenação do Curso de
Biomedicina, da Universidade Federal de Uberlândia,
para obtenção do grau de Bacharel em Biomedicina.

Uberlândia

2025

DEDICATÓRIA

A mim e a todos que me
acompanharam nessa
jornada. Pois, sem apoio
isso seria impossível.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à minha mãe, Margarete Alves da Silva Garcia, por me formar como pessoa, me acompanhar e se interessar por toda minha jornada acadêmica, do início às conversas mais complexas do que faço no laboratório e por me propiciar tanto amor, carinho, dedicação e cuidado, amo a senhora demais! Agradeço a meu pai, Heliodoro Garcia Neto, por ser o homem que mais admiro no mundo, por me fornecer condições de estudar e me dedicar totalmente ao que eu amo, sem me preocupar com mais nada, por ser um pai exemplar, atencioso, carinhoso, divertido e um parceiro para toda hora, eu amo o senhor! Agradeço a minha irmã, Kamilla Alves Garcia por ser a parte mais brilhante dessa família, a alegria de todos que a conhecem e uma mulher tão amorosa, te amo demais, maninha! Agradeço a minha parceira de vida Melissa Lima Almeida Gonçalves, obrigado por me apoiar, estar ao meu lado e me ensinar sobre amor, companheirismo e união, eu te amo! Obrigado, sem vocês, eu não teria chegado até aqui, vocês são a minha base.

Agradeço imensamente à minha orientadora, professora Veridiana de Melo Rodrigues Ávila, por ser uma profissional exemplar e, acima de tudo, um ser humano admirável. Obrigado por ter me acolhido, por nunca ter deixado de buscar ideias novas quando momentos delicados exigiam e por me proporcionar a oportunidade de crescer como pessoa e pesquisador. Devo dizer que nem nos meus melhores sonhos eu imaginaria ter a orientação de alguém tão incrível, dedicada e mãe, que sempre me tratou como parte de sua família. Você é inspiração, Veri.

Agradeço ao meu co-orientador, Vinícius Queiroz Oliveira, por nunca ter medido forças para me ajudar sempre que precisei e por ter se tornado um dos meus amigos mais próximos.

Agradeço aos meus colegas e amigos do LaBiTox, por fazerem com que nosso ambiente de trabalho seja um local tão leve e agradável de se estar.

Agradeço a Universidade Federal de Uberlândia, um bem público, que me permitiu estudar e completar uma etapa importantíssima da minha vida.

E, por fim, agradeço a todos aqueles que de alguma forma contribuíram com a minha jornada e com esse trabalho. Não me arriscaria a mencionar nominalmente cada um de vocês, pois sei que me esqueceria de nomes importantes. Afinal, ninguém faz ciência sozinho e colaboração é o que nos permite ir longe.

RESUMO

A toxoplasmose permanece um importante problema de saúde pública e carece de estratégias adjuvantes que modulem o hospedeiro para limitar a entrada, a disseminação e a sobrevivência do parasito *Toxoplasma gondii*. Fosfolipases A₂ do tipo Lys49 (PLA₂) de peçonha de serpentes têm sido implicadas em efeitos antiparasitários, entre elas, a BthTX-I, isolada da peçonha de *Bothrops jararacussu*, destaca-se por atuar por mecanismos não catalíticos mediados por superfície proteica. Neste trabalho, investigamos, in vitro a viabilidade de células BeWo e a proliferação de *T.gondii*, utilizando a BthTX-I como tratamento e, in silico, o potencial de interação da toxina com integrinas $\alpha 6\beta 1$ e $\alpha v\beta 3$, VEGFR2 e ICAM-1, alvos celulares relevantes para a infecção pelo parasito. O presente estudo avaliou diferentes abordagens de bioinformática como alinhamento/visualização de sequências (Clustal Omega/pyMSAviz), preparo de sequências FASTA (curadoria de PDB/modelos), docking (Boltz-2), estimativa comparativa de energia livre de ligação (PBEE) e mapeamento eletrostático (APBS/PyMOL). Alguns complexos ancoraram a BthTX-I em determinantes canônicos de reconhecimento, como: Na face de captura do domínio β -propeller de $\alpha 6\beta 1$ e na vizinhança do domínio MIDAS (compatível com o modo de ligação à laminina-511); Na entrada da região de reconhecimento ao RGD, no headpiece de $\alpha v\beta 3$ (interface β -propeller(α)/ β I(β)); E na junção D2–D3 de VEGFR2, crítica para dimerização induzida por VEGF-A. Além disso, a toxina se liga à ICAM-1 nos domínios distais D4–D5, associados a dimerização/clustering. Os mapas APBS evidenciaram complementaridade de cargas entre a face básica da BthTX-I e resíduos ácidos dos receptores, e o PBEE ordenou as afinidades, baseado em energia livre total relativas ($\alpha 6\beta 1 \geq \alpha v\beta 3 > \text{VEGFR2} > \text{ICAM-1}$). Além disso, em condições não citotóxicas à BeWo, a BthTX-I reduziu significativamente a proliferação do parasito, sustentando a relevância funcional das interações modeladas. Sendo assim, esses dados sugerem um modelo mecanístico no qual a BthTX-I pode ocupar/perturbar interfaces de adesão e sinalização: atenuando a transdução por integrinas $\beta 1/\beta 3$ (com impacto previsto na via FAK→Src→EGFR→STAT3 durante a invasão), dificultando a ativação de VEGFR2 por oclusão parcial de D2–D3 (com implicações para permeabilidade endotelial e trânsito tecidual) e reduzindo a avidéz de ICAM-1 por modulação distal de dimerização/clustering. Em conjunto, os resultados apoiam a BthTX-I como ferramenta molecular multialvo com potencial de modulação da célula do hospedeiro, gerando previsões futuras testáveis como (competição por RGD/laminina, imunofluorescência/colocalização dos alvos, mutagênese da região C-terminal da toxina) para validação de sua atividade

antiparasitária mediada por esses alvos moleculares. Este estudo fornece base estrutural e funcional coerente para explorar derivados/análogos de BthTX-I como adjuvantes no controle da toxoplasmose.

Palavras-chave: BthTX-I; ICAM-1; integrinas $\alpha 6\beta 1$, $\alpha v\beta 3$; *Toxoplasma gondii*; VEGFR2.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$\alpha\beta 1$ - integrin alpha-6 beta-1 (integrina $\alpha\beta 1$)

$\alpha v\beta 3$ - integrin alpha-v beta-3 (integrina $\alpha v\beta 3$)

ADMIDAS - adjacent to MIDAS (adjacent metal-ion–dependent adhesion site) (região adjacente ao sítio de adesão dependente de íon metálico, adjacente ao MIDAS)

AF-P05362-F1 - AlphaFold Protein Structure Database model identifier for ICAM-1 (entry AF-P05362-F1) (identificador de modelo da base de dados de estruturas AlphaFold para ICAM-1, entrada AF-P05362-F1)

AKT - protein kinase B (PKB) (proteína cinase B)

AMA1 - apical membrane antigen 1 (antígeno 1 de membrana apical)

APBS - Adaptive Poisson–Boltzmann Solver (solver adaptativo da equação de Poisson–Boltzmann)

BthTX-I - Bothropstoxin-I (Lys49 phospholipase A2 homologue from Bothrops jararacussu) (Bothropstoxina-I, homóloga Lys49 de fosfolipase A2 isolada da peçonha de Bothrops jararacussu)

CMYK - cyan, magenta, yellow and key (black) color space (espaço de cores ciano, magenta, amarelo e preto)

ColabFold - ColabFold (Google Colaboratory–based implementation of AlphaFold / AlphaFold-Multimer) (ColabFold, implementação do AlphaFold/AlphaFold-Multimer baseada no Google Colaboratory)

CPRG - chlorophenol red- β -D-galactopyranoside (clorofenol vermelho- β -D-galactopiranosídeo)

CSV - comma-separated values (valores separados por vírgulas)

ΔG - change in Gibbs free energy (Gibbs free energy change) (variação da energia livre de Gibbs)

Δ SASA - change in solvent-accessible surface area (variação da área de superfície acessível ao solvente)

DPI - dots per inch (pontos por polegada)

EGFR - epidermal growth factor receptor (receptor do fator de crescimento epidérmico)

EMBL-EBI - European Molecular Biology Laboratory – European Bioinformatics Institute (Laboratório Europeu de Biologia Molecular – Instituto Europeu de Bioinformática)

ERK - extracellular signal-regulated kinase (proteína cinase regulada por sinal extracelular)

FAK - focal adhesion kinase (proteína cinase de adesão focal)

FN - fibronectin (fibronectina)

FNIII9–10 / FNIII10 - fibronectin type III domains 9–10 (FNIII9–10) and fibronectin type III domain 10 (FNIII10) (domínios 9–10 e domínio 10 do tipo III de fibronectina)

GPU - graphics processing unit (unidade de processamento gráfico)

H-bonds - hydrogen bonds (ligações de hidrogênio)

ICAM-1 - intercellular adhesion molecule 1 (molécula de adesão intercelular 1)

ipTM - interface predicted TM-score (pontuação TM prevista para a interface)

JNK - c-Jun N-terminal kinase (proteína cinase N-terminal de c-Jun)

LFA-1 - lymphocyte function-associated antigen 1 (antígeno 1 associado à função de linfócitos)

Matplotlib - Matplotlib (Python plotting library for data visualization) (Matplotlib, biblioteca de gráficos em Python para visualização de dados)

MHC - Major Histocompatibility Complex (complexo principal de histocompatibilidade)

MIDAS - metal-ion-dependent adhesion site (sítio de adesão dependente de íon metálico)

MM/PBSA - molecular mechanics Poisson–Boltzmann surface area (mecânica molecular com superfície acessível ao solvente Poisson–Boltzmann)

MMseqs2 - Many-against-Many sequence searching (version 2) (busca de sequências muitos-contra-muitos, versão 2)

MMP-2 - matrix metalloproteinase-2 (metaloproteinase de matriz 2)

MOI - multiplicity of infection (multiplicidade de infecção)

MSA - multiple sequence alignment (alinhamento múltiplo de sequências)

MT1-MMP - membrane-type 1 matrix metalloproteinase (metaloproteinase de matriz tipo 1 associada à membrana)

MTT - 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio)

NRP1 - neuropilin-1 (neuropilina-1)

OpenDX (.dx) - Open Data Explorer format (.dx volumetric data file) (formato Open Data Explorer, arquivo de dados volumétricos .dx)

PB - Poisson–Boltzmann (equation/method) (equação/método de Poisson–Boltzmann)

PBEE - Protein Binding Energy Estimator (estimador de energia de ligação proteína–proteína)

PDB - Protein Data Bank (Banco de Dados de Proteínas)

PHSRN - Pro-His-Ser-Arg-Asn synergy-site motif (PHSRN sequence) of fibronectin (motivo sinérgico Pro-His-Ser-Arg-Asn da fibronectina)

PI3K - phosphoinositide 3-kinase (fosfoinosítídeo 3-cinase)

PLA2 - phospholipase A2 (fosfolipase A2)

PLC γ - phospholipase C gamma (fosfolipase C gama)

PNG - Portable Network Graphics (gráficos de rede portáteis – formato PNG)

PPI - protein–protein interaction(s) (interação(ões) proteína–proteína)

PyMOL - PyMOL Molecular Graphics System (sistema de gráficos moleculares PyMOL)

RCSB-PDB - Research Collaboratory for Structural Bioinformatics Protein Data Bank
(Protein Data Bank do Research Collaboratory for Structural Bioinformatics)

RGD - arginine–glycine–aspartic acid motif (RGD motif) (motivo arginina–glicina–ácido aspártico)

RON2 - rhoptry neck protein 2 (proteína 2 do pescoço da roptria)

ROS - reactive oxygen species (espécies reativas de oxigênio)

SASA - solvent-accessible surface area (área de superfície acessível ao solvente)

SVG - Scalable Vector Graphics (gráficos vetoriais escaláveis)

SyMBS - synergistic metal-binding site (sítio sinérgico de ligação a metal)

TSV - tab-separated values (valores separados por tabulação)

UniProt - Universal Protein Resource (recurso universal de proteínas)

VCAM-1 - vascular cell adhesion molecule 1 (molécula 1 de adesão celular vascular)

VEGF - vascular endothelial growth factor (fator de crescimento endotelial vascular)

VEGF-A - vascular endothelial growth factor A (fator de crescimento endotelial vascular A)

VEGFR2 - vascular endothelial growth factor receptor 2 (receptor 2 do fator de crescimento endotelial vascular)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	12
1.1 Toxoplasmose: uma zoonose negligenciada.....	12
1.2 Toxoplasma gondii: biologia, infecção e implicações clínicas.....	14
1.3. Alvos celulares e parasitários de interesse na infecção por Toxoplasma gondii.....	16
1.4. Toxinas Animais com Potencial Farmacológico.....	18
1.5. Fosfolipases A ₂ de peçonha de serpente.....	20
1.6. BthTX-I: propriedades estruturais e funcionais.....	23
2. OBJETIVO.....	26
2.1. Objetivo geral.....	26
2.2. Objetivos específicos.....	26
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	28
3.1 Obtenção da BthTX-I.....	28
3.2. Manutenção dos parasitos e células BeWo.....	28
3.3. Ensaio de Viabilidade Celular.....	29
3.4. Ensaio de Proliferação de T.gondii.....	29
3.5. Seleção das proteínas de interesse.....	30
3.6. Recuperação das sequências FASTA das proteínas de interesse e da BthTX-I.....	30
3.7. Alinhamento de sequências e visualização (Clustal Omega + pyMSAviz).....	31
3.8. Docking molecular (Boltz-2).....	32
3.9. Cálculo da energia livre de ligação (PBEE).....	32
3.10. Visualização e análise de interações moleculares dos complexos proteína-proteína (PyMOL e Discovery Studio Visualizer).....	33
3.11. Geração de imagens de qualidade (PyMOL).....	33
3.12. Visualização de superfície eletrostática (APBS Electrostatics Plugin).....	34
4. RESULTADOS.....	34
4.1. Obtenção da BthTX-I.....	34
4.2. Ensaio de Viabilidade celular.....	35
4.3 Seleção dos alvos moleculares.....	36

4.4. Ensaio de Proliferação de <i>T. gondii</i>	37
4.5. Alinhamento entre BthTX-I e alvos moleculares.....	38
4.6. Docking molecular, interações identificadas e visualizações tridimensionais.....	41
4.6.1. BthTX-I + $\alpha 6\beta 1$	42
4.6.3. BthTX-I + $\alpha v\beta 3$	44
4.6.4. BthTX-I + VEGFR2.....	45
4.6.5. BthTX-I + ICAM-1.....	47
4.7. Visualização de superfície eletrostática (APBS Electrostatics Plugin).....	48
4.8. Energia livre de ligação (PBEE).....	52
5. DISCUSSÃO.....	53
5.1. Interação Molecular da BthTX-I com Proteínas de Membrana: Mapeamento dos Domínios Estruturais de Ligação.....	53
5.2. Implicações Funcionais para a Inibição da Infecção por <i>Toxoplasma gondii</i> : Proposta de Modelo Mecanístico.....	58
6. CONCLUSÃO.....	63
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	64

1. INTRODUÇÃO

1.1 Toxoplasmose: uma zoonose negligenciada

A toxoplasmose, causada pelo protozoário intracelular *Toxoplasma gondii*, é reconhecida como uma das infecções parasitárias mais prevalentes no mundo. Estima-se que até um terço da população humana seja portadora assintomática (Montoya & Liesenfeld, 2004; Bağcı & Ünlü, 2024).

Apesar de geralmente benigna em indivíduos imunocompetentes, a toxoplasmose apresenta elevadas taxas de morbidade e mortalidade em populações vulneráveis, como imunossuprimidos (HIV+/AIDS [HIV-positive and acquired immunodeficiency syndrome], transplantados) e gestantes. Nesses grupos, a infecção pode resultar em encefalite toxoplásmica, lesões oculares ou infecção congênita grave, com consequências que incluem retardo mental, anomalias neurológicas e abortamento (Halonen & Weiss, 2013).

Meta-análises publicadas entre 2020 e 2025 indicam que a soroprevalência global permanece elevada. Uma síntese de 320 estudos em 113 países estimou, aproximadamente, 31% na população geral, com a maior incidência na América do Sul ($\approx 45\%$) e na África ($\approx 42\%$), já o Brasil se destaca entre os países com maior prevalência (até $\approx 68\%$) (Sengupta et al., 2025). Em gestantes, duas revisões independentes estimaram prevalências globais de 33,8% (Rostami et al., 2020) e 36,6% (Salari et al., 2025), com América do Sul acima de 50% e forte contribuição de estudos brasileiros, reforçando a importância regional e o risco para a transmissão vertical (passagem de um agente infeccioso da mãe para o conceito ou para o recém-nascido, ocorrendo durante a gestação, no parto ou no período pós-natal imediato por meio da amamentação).

Nesse contexto, a toxoplasmose congênita corresponde à forma da doença em que o feto ou o recém-nascido é infectado pelo *T. gondii* em decorrência da transmissão transplacentária do parasito durante a gestação, na maioria das vezes após uma infecção primária adquirida pela gestante nesse período. Nessa situação, os taquizoítos circulantes atravessam a barreira placentária e alcançam a circulação fetal, podendo acometer diferentes tecidos e originar um amplo espectro de manifestações clínicas, que inclui desde aborto espontâneo, óbito fetal e prematuridade até quadros de comprometimento neurológico e ocular grave, ou ainda infecções assintomáticas ao nascimento com risco de sequelas tardias, como retinocoroidite e

déficit neurocognitivo (BOLLANI, et al., 2022). Além disso, quando a mãe é infectada pela primeira vez durante a gravidez, o risco de transmissão vertical aumenta progressivamente com o avanço do trimestre, embora as sequelas fetais sejam mais graves quando a transmissão ocorre no primeiro trimestre (Montoya & Liesenfeld, 2004; Dunn et al., 1999). Ademais, por se tratar de uma condição potencialmente grave, mas prevenível por medidas de prevenção primária e, em alguns contextos, por rastreamento sorológico e tratamento da gestante, a toxoplasmose congênita é reconhecida como um importante problema de saúde pública (COELHO, et al., 2024).

A respeito do impacto da doença, a estimativa de referência do *Burden of Disease* para toxoplasmose congênita permanece a de Torgerson & Mastroiacovo (2013), com ≈ 190 mil casos incidentes/ano e $\approx 1,2$ milhão de DALYs (ano de vida ajustado por incapacidade) globalmente, ainda que anterior, esse estudo segue citado por órgãos reguladores e revisões contemporâneas como indicativo da relevância de Toxoplasmose (Torgerson & Mastroiacovo, 2013).

Além disso, as vias de transmissão dessa infecção justificam ações de saúde pública. Para além de carnes cruas ou mal cozidas, Calero-Bernal e seus colaboradores, em 2025 realizaram um estudo em 10 países europeus, que detectou oocistos de *T. gondii* em 4,1% (IC95%: 3,4–4,8%) de amostras de saladas prontas para consumo (*ready-to-eat*) adquiridas no varejo (2021–2022), destacando a importância de controles na cadeia produtiva e de recomendações de higiene alimentar para grupos de risco. Somado a isso, no Brasil, destacam-se surtos veiculados por água, como o episódio de 2019 em São Paulo com aumento expressivo de casos agudos e envolvimento ocular, reforçando a necessidade de monitoramento da água de abastecimento (Finamor et al., 2024).

Dessa maneira, a toxoplasmose continua sendo classificada como uma doença negligenciada, principalmente nos contextos em que seus efeitos sistêmicos são menos aparentes. Ou seja, análises atuais em epidemiologia aplicada apontam lacunas de vigilância e subnotificação em múltiplos contextos, inclusive países de alta renda, mantendo a toxoplasmose no grupo de zoonoses sub priorizadas do ponto de vista programático (Cook et al., 2024; ECDC/WHO menções).

1.2 *Toxoplasma gondii*: biologia, infecção e implicações clínicas

O *Toxoplasma gondii* é um protozoário intracelular obrigatório do filo Apicomplexa, portador de um complexo apical altamente especializado, que inclui micronemas (MICs), roptrias (ROPs) e grânulos densos (GRAs). Essas organelas secretoras são responsáveis por liberar proteínas-chave que permitem a adesão, penetração e estabelecimento do parasito dentro das células hospedeiras, garantindo sua sobrevivência e replicação (Black & Boothroyd, 2000; Webster & Dubey, 2010). A ampla capacidade de infectar células nucleadas de mamíferos e aves, aliada a uma distribuição geográfica cosmopolita, faz do *T. gondii* um dos parasitos mais bem-sucedidos do ponto de vista epidemiológico.

O ciclo de vida do parasito é heteroxênico e envolve dois tipos de hospedeiros. Nos hospedeiros definitivos, representados exclusivamente pelos felídeos, ocorre a reprodução sexuada no epitélio intestinal. Após a diferenciação gametogônica, formam-se oocistos não esporulados que são eliminados nas fezes. Em condições ambientais favoráveis, esses oocistos esporulam em um período de 1 a 5 dias, tornando-se infectantes. Cada oocisto contém dois esporocistos, com quatro esporozoítos cada, que permanecem viáveis no ambiente por meses ou até anos (Webster & Dubey, 2010). Nos hospedeiros intermediários, que incluem seres humanos, outros mamíferos e aves, a infecção ocorre predominantemente pela ingestão de oocistos esporulados, cistos teciduais presentes em carnes cruas ou mal cozidas e por água contaminada que pode ser ingerida ou que pode ser usada para irrigação e limpeza de alimentos. Outras vias incluem a transmissão congênita, transfusão sanguínea e transplante de órgãos (Montoya & Liesenfeld, 2004).

Após a penetração no trato digestório, os esporozoítos ou bradizoítos liberados invadem células epiteliais e se diferenciam em taquizoítos, a forma replicativa e disseminadora do parasito. A invasão celular é um processo ativo que envolve a liberação sequencial de proteínas de micronemas, responsáveis pela adesão inicial, seguida pela ação de proteínas de roptrias e grânulos densos, que remodelam a membrana hospedeira para formar o vacúolo parasitóforo (Black & Boothroyd, 2000). Esse vacúolo protege o parasito da fusão com lisossomos, permitindo sua multiplicação intracelular por endodiogenia. A lise celular subsequente libera novos taquizoítos, que infectam células adjacentes ou atingem tecidos distantes via corrente sanguínea.

A resposta imune mediada por interferon-gama (IFN- γ) induz a conversão dos taquizoítos em bradizoítos, que formam cistos intracelulares principalmente no cérebro, retina e musculatura esquelética. Essa fase crônica pode persistir por toda a vida do hospedeiro e reativar-se em condições de imunossupressão (Webster & Dubey, 2010; Halonen & Weiss, 2013). Estudos mostram que os cistos teciduais possuem parede espessa e resistentes mecanismos de evasão imunológica, incluindo a modulação da expressão de moléculas do Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC) e a interferência em vias de sinalização inflamatória (Black & Boothroyd, 2000).

O tratamento farmacológico da toxoplasmose gestacional e congênita ainda se apoia, há décadas, em esquemas clássicos, com eficácia limitada e toxicidade relevante. Nas gestantes com infecção aguda, sem evidência de acometimento fetal, utiliza-se preferencialmente a espiramicina, com o objetivo de reduzir a transmissão transplacentária e na presença de infecção fetal confirmada ou altamente suspeita, recomenda-se a combinação de pirimetamina, sulfadiazina e ácido folínico até o final da gestação (Pessanha et al., 2011; CDC, 2024; Casemiro et al., 2025).

Em recém-nascidos com toxoplasmose congênita, diretrizes internacionais e brasileiras indicam um regime prolongado (≈ 12 meses) com pirimetamina associada a uma sulfonamida e ácido folínico, visando reduzir a carga parasitária e o risco de sequelas neurológicas e oculares (McLeod, 2014; Saso et al., 2020; Casemiro et al., 2025). Entretanto, a pirimetamina é um antagonista do ácido fólico que inibe a diidrofolato redutase, podendo causar supressão da medula óssea com pancitopenia (neutropenia, anemia e trombocitopenia), o que exige suplementação obrigatória com ácido folínico e monitorização hematológica frequente. Já as sulfonamidas estão associadas a reações de hipersensibilidade cutânea, hepatotoxicidade e, em situações específicas, risco aumentado de hiperbilirrubinemia neonatal, além de restrições de uso em fases precoces ou tardias da gestação (Ben-Harari; Goodman; Kasper, 2017; Ardabili et al., 2021; CDC, 2024; Casemiro et al., 2025). Somam-se a isso a necessidade de tratamentos longos, problemas de adesão, indisponibilidade ou custo dos fármacos em determinados contextos e, sobretudo, o fato de que os tratamentos vigentes atuam predominantemente sobre taquizoítos, com pouca ou nenhuma ação sobre cistos teciduais, não eliminando a infecção latente e permitindo reativações em indivíduos imunossuprimidos (Alday; Doggett, 2017; Hajj et al., 2021; Ramos et al., 2024).

Essas limitações terapêuticas, reforçam a importância de investigar novas moléculas com melhor perfil de segurança e mecanismos de ação complementares, incluindo compostos bioativos como toxinas de peçonha de serpente, capazes de interferir em etapas críticas da invasão ou persistência do *T. gondii*.

1.3. Alvos celulares e parasitários de interesse na infecção por *Toxoplasma gondii*

A compreensão das interações moleculares entre *Toxoplasma gondii* e as células hospedeiras é essencial para identificar alvos que possam ser explorados no desenvolvimento de estratégias terapêuticas. Durante o processo de invasão, o parasito utiliza um conjunto coordenado de proteínas de superfície e organelas secretoras, como micronemas, roptrias e grânulos densos, que interagem com receptores e componentes estruturais da célula hospedeira, permitindo adesão, penetração e estabelecimento da infecção (Tenter et al., 2000; Portes et al., 2020).

Entre esses componentes, as proteínas de micronema desempenham papel central. O complexo MIC2–M2AP é um exemplo bem caracterizado, sendo que a porção A de MIC2, de domínio integrin-like, interage com glicoconjugados, heparina e componentes da matriz extracelular, facilitando a adesão inicial (Harper et al., 2004; Wang et al., 2014). Evidências indicam que MIC2 pode reconhecer receptores específicos na superfície celular, incluindo integrinas, reforçando seu papel como ponto estratégico de bloqueio para impedir a entrada do parasito (Harper et al., 2004; Wang et al., 2014).

Outro mecanismo importante na invasão é o complexo (apical membrane antigen 1 [AMA1–RON2] rhoptry neck protein 2), localizado, respectivamente, em micronemas e roptrias. A interação direta entre AMA1 e RON2 é determinante para a formação e manutenção da junção móvel (moving junction, MJ), estrutura transmembrana essencial que ancora o parasito à célula hospedeira durante a penetração ativa (Lamarque et al., 2011). A plasticidade observada entre diferentes pares AMA–RON confere redundância ao processo, garantindo que a invasão ocorra mesmo diante de variações ambientais ou bloqueios pontuais (Lamarque et al., 2014).

Além desses mecanismos clássicos de adesão e penetração, outras moléculas de superfície e receptores da célula hospedeira desempenham papéis relevantes na patogênese. Entre eles destacam-se integrinas, receptores de crescimento como VEGFR2 (vascular endothelial

growth factor receptor 2), moléculas de adesão como ICAM-1 (intercellular adhesion molecule 1) e glicoproteínas de membrana, que participam tanto da facilitação da entrada quanto da modulação de respostas imunes locais (Portes et al., 2020). Essas interações não apenas permitem o sucesso da invasão, mas também influenciam a remodelação do citoesqueleto, a sinalização intracelular e a modulação da imunidade, criando um ambiente favorável à replicação do parasito.

As integrinas, receptores heterodiméricos transmembrana, conectam o citoesqueleto celular à matriz extracelular. Subtipos como $\alpha 6 \beta 1$ (integrina $\alpha 6 \beta 1$) e $\alpha v \beta 3$ (integrina $\alpha v \beta 3$) já foram implicados na adesão de *T. gondii*, promovendo sinalização fora-dentro (outside-in), ativação de quinases como FAK (focal adhesion kinase) e reorganização de actina, facilitando a motilidade do parasito e sua internalização (Portes et al., 2020). A proteína MIC2, através de seu domínio integrin-like A, pode ligar-se diretamente a essas integrinas, promovendo ajustes finos na arquitetura do citoesqueleto para favorecer a invasão (Harper et al., 2004; Wang et al., 2014).

O receptor tirosina-quinase VEGFR2, conhecido por regular a angiogênese e a permeabilidade vascular, também pode ser explorado pelo parasito. Sua modulação pode induzir alterações na dinâmica de actina e na morfologia celular, beneficiando a penetração e a replicação intracelular (Portes et al., 2020). Em modelos de interface materno-fetal, foi demonstrado que a Lys49-PLA₂ (Lysine49-phospholipase A₂) MjTX-II, de *Bothrops moojeni*, reduziu níveis de VEGF (vascular endothelial growth factor) e inibiu a proliferação de *T. gondii*, efeito parcialmente revertido pela adição de VEGF recombinante. Análises *in silico* indicaram que a toxina pode interagir diretamente com VEGFR2, possivelmente bloqueando regiões de ligação ao ligante ou domínios regulatórios, o que correlaciona a modulação desse receptor com efeitos antiparasitários (Teixeira et al., 2025).

A ICAM-1, presente em células endoteliais, epiteliais e trofoblásticas, está associada à adesão leucocitária e à transmigração celular. Na toxoplasmose, pode facilitar o contato célula–parasito e contribuir para a disseminação tecidual (Portes et al., 2020). A diversidade dessas interações permite que *T. gondii* adapte sua estratégia de invasão a diferentes tecidos e hospedeiros, contribuindo para sua ampla gama de alvos.

1.4. Toxinas Animais com Potencial Farmacológico

A toxinologia, campo dedicado ao estudo de toxinas de origem animal, vegetal e microbiana, tem desempenhado papel fundamental na descoberta e desenvolvimento de novas ferramentas diagnósticas e terapêuticas. No caso específico das toxinas animais, a caracterização estrutural e funcional desses compostos revelou um vasto potencial biotecnológico e farmacológico (Kim et al., 2025; Diniz-Sousa et al., 2023).

Historicamente, algumas das aplicações mais bem-sucedidas derivadas de toxinas animais incluem o desenvolvimento de fármacos amplamente utilizados na clínica. O captopril, um inibidor da enzima conversora de angiotensina (ECA) derivado de peptídeos presentes na peçonha da jararaca (*Bothrops jararaca*), foi um marco na terapêutica cardiovascular, abrindo caminho para a exploração de outras moléculas bioativas (Diniz-Sousa et al., 2023). Outro exemplo notável é a ziconotida, um peptídeo sintético baseado em toxinas de *Conus magus*, utilizada para manejo de dor crônica refratária (Kim et al., 2025). Esses casos ilustram como toxinas, inicialmente associadas à toxicidade e risco biológico, podem ser convertidas em medicamentos seguros e eficazes quando submetidas a processos rigorosos de purificação, modificação estrutural e validação clínica.

O avanço de áreas como proteômica, transcriptômica e bioinformática, aliado a técnicas modernas de purificação e cristalografia de raios X, permitiu o mapeamento detalhado da composição molecular das peçonhas, identificando toxinas com ações altamente específicas sobre receptores, canais iônicos e enzimas de importância médica (Roman-Ramos & Ho, 2024). Tais características conferem a essas moléculas a capacidade de modular processos fisiológicos de forma precisa, tornando-as valiosas candidatas a fármacos para o tratamento de doenças cardiovasculares, inflamatórias, oncológicas, autoimunes e infecciosas (Kim et al., 2025; Zona Rubio et al., 2025).

Inovações recentes também têm explorado a engenharia molecular de toxinas. O uso de ferramentas como a modelagem estrutural *de novo* e a inteligência artificial possibilitou o desenvolvimento de proteínas sintéticas capazes de neutralizar neurotoxinas letais, como as da família three-finger toxins (3FTx), presentes em serpentes da família Elapidae (Vázquez Torres et al., 2025). Além disso, o registro crescente de patentes voltadas a toxinas de peçonha reflete o interesse global no aproveitamento dessas biomoléculas em áreas como

terapia-alvo contra câncer, tratamento de distúrbios neurodegenerativos e desenvolvimento de agentes antimicrobianos (Zona Rubio et al., 2025).

Tecnologias que combinam análises *ômicas*, bioinformática, química sintética e ensaios funcionais, têm acelerado a triagem e caracterização de toxinas promissoras (Roman-Ramos & Ho, 2024). Esses avanços facilitam a descoberta de novos compostos bioativos, mas também reduzem custos e tempo de desenvolvimento, tornando mais acessível a criação de terapias inovadoras (Gutiérrez et al., 2025).

Apesar dos progressos, desafios significativos ainda limitam a transposição das descobertas laboratoriais para a prática clínica. Entre eles, destacam-se a baixa disponibilidade de matéria-prima, a complexidade estrutural de certas toxinas e as barreiras regulatórias para o registro de novos biofármacos (Gutiérrez et al., 2025). Ainda assim, a aplicação racional de toxinas animais permanece como uma das áreas mais promissoras da biomedicina, sustentada por sua elevada especificidade molecular e potencial de inovação terapêutica.

Entre as diferentes famílias de toxinas de peçonha com potencial terapêutico, as fosfolipases A₂ (PLA₂) de serpentes ocupam posição de destaque, uma vez que combinam diversidade estrutural, alta especificidade e capacidade de modular processos celulares envolvidos em doenças cardiovasculares, inflamatórias, oncológicas, autoimunes e infecciosas (Roman-Ramos & Ho, 2024; Kim et al., 2025; Zona Rubio et al., 2025; Diniz-Sousa et al., 2023).

No contexto das infecções parasitárias, por exemplo, derivados peptídicos do segmento C-terminal da BthTX-I, uma Lys49-PLA₂ proveniente da peçonha de *Bothrops jararacussu*, exibem atividade antimicrobiana contra bactérias multirresistentes e inibem proteases virais como a papain-like protease (PLpro) do severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2), mantendo baixa citotoxicidade para células de mamíferos, o que reforça o valor das PLA₂ como moléculas para o desenvolvimento racional de agentes anti-infecciosos (Santos-Filho et al., 2017; Bitencourt et al., 2023). De forma complementar, toxinas Lys49-PLA₂ foram identificadas como antagonistas de VEGFR2/KDR, evidenciando sua capacidade de interagir com receptores-chave em vias angiogênicas de interesse oncológico (Yamazaki et al., 2005).

1.5. Fosfolipases A₂ de peçonha de serpente

As fosfolipases A₂ (PLA₂) presentes em peçonhas de serpentes formam uma família de proteínas amplamente distribuída no reino animal, caracterizada pela hidrólise da ligação éster na posição sn-2 de glicerofosfolipídios, com liberação de ácidos graxos livres e lisofosfolipídios (Kini & Evans, 1987). Nos acidentes ofídicos, essas enzimas ocupam posição central na toxicidade local e sistêmica, contribuindo para miotoxicidade, neurotoxicidade, anticoagulação, edema, cardiotoxicidade e morte celular (Gutiérrez & Lomonte, 1995; Lomonte & Rangel, 2012).

Estruturalmente, as PLA₂ de serpentes são proteínas pequenas ($\approx 13\text{--}15$ kDa), ricamente estabilizadas por pontes dissulfeto e compartilhando uma dobra tridimensional conservada, composta por uma hélice α N-terminal, um loop de ligação ao cálcio, um núcleo central predominantemente β e uma região C-terminal envolvida na interação com membranas (Lomonte & Rangel, 2012; Borges et al., 2023). A classificação funcional mais utilizada se baseia no resíduo da posição 49:

Asp49 PLA₂ – cataliticamente ativas, dependentes de Ca²⁺ e com alta atividade enzimática;

Lys49 PLA₂ – cataliticamente inativas, devido à substituição de Asp49 por Lys49, mas altamente tóxicas por mecanismos não enzimáticos mediados por interação direta com membranas celulares (Lomonte & Rangel, 2012; Zambelli et al., 2017).

Nas Lys49 PLA₂, a perda de atividade catalítica é compensada por um mecanismo de desestabilização de membranas dependente de interações eletrostáticas e hidrofóbicas, mediado principalmente pela região C-terminal, rica em resíduos básicos (Lys, Arg) que reconhecem fosfolipídios aniônicos e favorecem a inserção de segmentos hidrofóbicos na bicamada (Lomonte & Rangel, 2012; Borges et al., 2023). Mutações ou modificações em resíduos como Lys115, Lys116 e Arg118 reduzem drasticamente a miotoxicidade, destacando esses resíduos como determinantes críticos de interação com membranas (Zambelli et al., 2017). Estudos de microscopia e imageamento de Ca²⁺ em miócitos expostos a PLA₂ mostraram ainda que essas toxinas podem interagir com receptores ou aceptores específicos na superfície celular, promovendo influxo maciço de Ca²⁺, ativação de fosfolipases endógenas e degradação de membranas (Cintra-Francischinelli et al., 2009).

Dentro desse contexto, a BthTX-I representa um dos modelos mais estudados de PLA₂ Lys49, reunindo alta miotoxicidade, estrutura bem caracterizada e forte capacidade de interação com membranas por mecanismos independentes de catálise (Lomonte & Rangel, 2012; Borges et al., 2023).

Além disso, fosfolipases A₂ do tipo Lys49 presentes nas peçonhas de serpentes do gênero *Bothrops* têm sido objeto de crescente interesse como moléculas bioativas com potencial antiparasitário. Embora sejam cataliticamente inativas devido à substituição do resíduo aspartato por lisina na posição 49, estas toxinas apresentam pronunciada atividade citotóxica mediada por mecanismos não enzimáticos, incluindo a interação direta com membranas celulares e a subsequente desorganização da bicamada lipídica (Lomonte & Rangel, 2012). No contexto da toxoplasmose, estudos recentes sugerem que tais mecanismos podem ser explorados para interferir em etapas críticas do ciclo de vida de *Toxoplasma gondii*.

Inicialmente, Borges e colaboradores avaliaram a ação da mesma BnSP-7 sobre taquizoítos de *T. gondii* in vitro, demonstrando que, em concentrações não citotóxicas para células HeLa, a toxina não alterou a viabilidade dos taquizoítos, mas reduziu de forma significativa a adesão e a proliferação intracelular quando os parasitos eram pré-tratados antes da infecção, além de modular a liberação de IL-6 e MIF pelas células hospedeiras (Borges et al., 2016).

Mais recentemente, essa linha de investigação foi expandida para toxinas estruturalmente relacionadas ao contexto da interface materno-fetal. Teixeira e seus colaboradores em 2025 demonstraram que a MjTX-II, uma Lys49-PLA₂ isolada da peçonha de *Bothrops moojeni*, em concentrações não citotóxicas, reduz a invasão e o crescimento intracelular de *T. gondii* em células trofoblásticas BeWo e em explantes vilosos de placenta humana de terceiro trimestre, associando esse efeito ao aumento de espécies reativas de oxigênio (ROS), à modulação de citocinas pró-inflamatórias e à redução da produção de VEGF, além disso, por meio de docking molecular, os autores ainda mostraram que MjTX-II é capaz de se ligar a VEGFR2 e ICAM-1, sugerindo um mecanismo que integra modulação de angiogênese e adesão celular na redução da infecção. Somado a isso, estudos recentes evidenciaram que a BthTX-II, apesar de ser uma Asp49-PLA₂ de *Bothrops jararacussu*, também exerce potente efeito anti-*T. gondii* em células BeWo e em explantes placentários humanos, interferindo diretamente nas etapas iniciais de adesão e invasão e reduzindo a proliferação do parasito em concentrações não citotóxicas, além de induzir aumento de IL-6, IL-8 e MIF e diminuição de VEGF,

levantando a hipótese de participação da via VEGF/VEGFR2 como alvo relevante para a ação antiparasitária dessa toxina (Oliveira et al., 2025).

O potencial antiparasitário das Lys49-PLA₂ é corroborado por trabalhos com outros protozoários patogênicos. Nunes et al. (2013) demonstraram que a BnSP-7 causa alterações profundas na morfologia e na ultraestrutura de *Leishmania (L.) amazonensis*, incluindo desorganização da membrana plasmática, alterações mitocondriais e formação de vesículas citoplasmáticas. Esses achados sustentam a hipótese de que a ação sobre *T. gondii* também envolve danos diretos a membranas, modulados por interações eletrostáticas entre resíduos básicos da região C-terminal e fosfolipídios aniônicos presentes nas membranas do parasito.

Estudos estruturais recentes reforçam o papel de regiões específicas na atividade dessas toxinas. Salvador et al. (2023) evidenciaram que resíduos da região C-terminal, como Lys115, Lys116 e Arg118, são críticos para a mitotoxicidade, e possivelmente também para o efeito antiparasitário, uma vez que participam ativamente na ancoragem da toxina à membrana. Essa característica é compartilhada pela BthTX-I, cuja estrutura homodimérica e conformação superficial favorecem múltiplos pontos de contato com a bicamada lipídica, potencializando sua capacidade de causar lise celular.

Além do dano direto às membranas do parasito, há indícios de que as Lys49-PLA₂ possam modular componentes da célula hospedeira que são cruciais para a infecção. Por exemplo, estudos com outras PLA₂ de *Bothrops* indicam que essas toxinas podem interagir com receptores ou glicoproteínas de superfície, alterando vias de sinalização e comprometendo a adesão ou penetração do parasito (Salvador et al., 2013). Esse mecanismo é particularmente relevante no caso de *T. gondii*, que depende de interações específicas com receptores como integrinas, ICAM-1 e VEGFR2 para completar seu processo de invasão e proliferação.

A ação das Lys49-PLA₂ contra protozoários também pode envolver modulação de respostas inflamatórias. BnSP-7, por exemplo, induz liberação de mediadores inflamatórios e aumento de permeabilidade vascular (Nunes et al., 2013), o que poderia criar um microambiente desfavorável para o desenvolvimento do parasito. Embora esses efeitos ainda não tenham sido diretamente estudados para *T. gondii*, eles representam um campo promissor para investigações futuras.

1.6. BthTX-I: propriedades estruturais e funcionais

A BthTX-I é uma fosfolipase A₂ do tipo Lys49, isolada da peçonha de *Bothrops jararacussu*, que se caracteriza pela ausência de atividade catalítica, apesar de manter uma arquitetura tridimensional altamente conservada em relação às PLA₂ Asp49 cataliticamente ativas (da Silva Giotto et al., 1998; Arni & Ward, 1996; Gomes et al., 2020). Essa conservação estrutural, aliada a particularidades de superfície e à presença de uma região C-terminal altamente catiônica, sustenta um mecanismo de ação essencialmente não enzimático, baseado na interação direta com membranas e proteínas de superfície celular.

A estrutura da BthTX-I, elucidada por cristalografia de raios X, revela uma proteína de aproximadamente 13,7 kDa com a dobra típica de PLA₂, composta por uma α -hélice N-terminal, um núcleo central de folhas β antiparalelas flanqueadas por hélices α , e uma α -hélice C-terminal envolvida na interação com membranas (Arni & Ward, 1996; da Silva Giotto et al., 1998). O sítio catalítico é estruturalmente preservado, mas a substituição do Asp49 por Lys49 impede a coordenação do íon Ca²⁺, inviabilizando a hidrólise de fosfolipídios (Arni & Ward, 1996). Do ponto de vista quaternário, a BthTX-I organiza-se predominantemente como um homodímero estabilizado por interações hidrofóbicas e pontes de hidrogênio envolvendo resíduos das regiões N-terminal e central (da Silva Giotto et al., 1998; Fernandes et al., 2010).

Estudos cristalográficos com BthTX-I e outros homólogos Lys49 evidenciam a existência de uma região de “dobradiça” molecular (hinge) que conecta domínios estruturais e permite rearranjos conformacionais dependentes do ambiente, com diferentes estados oligoméricos descritos para a toxina (da Silva Giotto et al., 1998; Ullah et al., 2012). Essa flexibilidade afeta a orientação de resíduos hidrofóbicos e da porção C-terminal, modulando a capacidade de interação com membranas. A porção C-terminal (resíduos 115–129) é particularmente importante, apresentando caráter anfipático e alta densidade de resíduos básicos, como lisina e arginina, o que favorece interações eletrostáticas com fosfolipídios aniônicos e posterior inserção de segmentos hidrofóbicos na bicamada lipídica (Lomonte et al., 2003; Ullah et al., 2012). Alterações nessa região, por mutações pontuais ou modificações químicas, reduzem significativamente a capacidade de interação com membranas e a miotoxicidade, demonstrando que o segmento C-terminal concentra determinantes estruturais críticos para a atividade biológica (Fernandes et al., 2010; Cintra-Francischinelli et al., 2010).

Do ponto de vista fisiopatológico, a BthTX-I é reconhecida como uma potente miotoxina, responsável por necrose de fibras musculares esqueléticas por mecanismos independentes de atividade enzimática (Lomonte & Rangel, 2012). A interação da toxina com a membrana de miócitos desencadeia influxo maciço de Ca^{2+} , ativando fosfolipases endógenas e proteases intracelulares, o que culmina na ruptura da integridade sarcoplasmática e na liberação de creatina quinase e outros marcadores de lesão muscular (Cintra-Francischinelli et al., 2010; Gutiérrez & Lomonte, 1995). Em modelos *in vivo*, a miotoxicidade é acompanhada por edema, infiltrado inflamatório e necrose coagulativa, seguidos por regeneração muscular tardia, o que contribui de forma importante para o dano local observado nos acidentes botrópicos (Gutiérrez & Lomonte, 1995; Lomonte & Rangel, 2012).

Além do dano local, a BthTX-I e outras PLA_2 do tipo Lys49 participam de manifestações sistêmicas por meio da liberação de mediadores inflamatórios, aumento da permeabilidade vascular e alterações hemostáticas, especialmente quando atuam em sinergia com outras toxinas da peçonha (Gutiérrez et al., 2008; Mora-Obando et al., 2014). No caso específico da BthTX-I, dados experimentais demonstram que a toxina induz inflamação, ativação de inflamassoma NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3 (NLRP3) e produção de citocinas pró-inflamatórias, reforçando seu papel como moduladora da resposta imune inata (Boeno et al., 2019; Cedro et al., 2018).

No contexto de toxinologia estrutural, a BthTX-I tornou-se um modelo central para o estudo de inibidores naturais e sintéticos de PLA_2 . Compostos fenólicos como ácido rosmarínico, ácido cafeico e ácido aristoloquínico mostraram capacidade de se ligar a regiões alostéricas próximas ao canal hidrofóbico e/ou à região C-terminal de toxinas Lys49, interferindo na ativação estrutural e reduzindo de forma significativa a miotoxicidade, o edema e a dor em modelos experimentais (Ticli et al., 2005; dos Santos et al., 2011; Fernandes et al., 2015). Esses achados consolidam o uso da BthTX-I e de homólogos Lys49 como plataformas para o desenvolvimento de inibidores estruturais com potencial uso como terapias adjuvantes em acidentes ofídicos e como protótipos de moléculas bioativas.

As propriedades de reconhecimento de membranas e a especificidade de interação com determinados tipos celulares também sustentam outras aplicações dessa toxina. Peptídeos derivados do segmento C-terminal de BthTX-I, como p-BthTX-I e seu dímero (p-BthTX-I)₂, exibem atividade antimicrobiana contra bactérias multirresistentes, mantendo baixa

citotoxicidade para células de mamíferos, e têm sido otimizados por modificações na dimerização e no conteúdo de lisinas para aumentar estabilidade sérica e potência antibacteriana (Santos-Filho et al., 2017; Bitencourt et al., 2023; Bicho et al., 2024). Além disso, formas modificadas de BthTX-I e peptídeos derivados de sua região C-terminal apresentam efeitos antitumorais e antitrombóticos *in vivo*, e a própria toxina, em associação com BthTX-II, (uma PLA₂ Asp-49 de *B. jararacussu*) já foi descrita como capaz de inibir a infecção por vírus como Zika e hepatite C, evidenciando um amplo espectro de aplicações farmacológicas potenciais (Gebrim et al., 2009; Cassani et al., 2023; Pereira et al., 2025; Nogueira et al., 2023).

Por fim, estudos recentes demonstram que a BthTX-I também exibe atividade antimicrobiana *in vivo* em modelos de frangos de corte, reduzindo a carga bacteriana intestinal sem comprometer parâmetros histológicos ou de desempenho zootécnico, o que reforça seu potencial como ferramenta biotecnológica em diferentes contextos, do desenvolvimento de novos antimicrobianos à formulação de adjuvantes terapêuticos (Silveira et al., 2021; Assis et al., 2022). Nesse cenário, a combinação de uma estrutura tridimensional bem caracterizada, um mecanismo de ação não enzimático dependente de interações proteína-membrana e proteína-proteína, e um portfólio crescente de aplicações farmacológicas torna a BthTX-I um modelo atrativo para investigar interações com receptores de superfície celular de interesse biomédico. No contexto deste trabalho, tais características justificam a exploração, por abordagens *in silico*, da interação da BthTX-I com proteínas envolvidas na infecção por *Toxoplasma gondii* e na resposta da célula hospedeira, como integrinas, VEGFR2 e ICAM-1.

2. OBJETIVO

2.1. Objetivo geral

Investigar, através da bioinformática estrutural e ensaios celulares, o potencial de interação da BthTX-I (PLA₂ Lys49 de *Bothrops jararacussu*) com proteínas-alvo do hospedeiro relevantes para a infecção por *Toxoplasma gondii* (integrinas $\alpha 6\beta 1$ e $\alpha v\beta 3$, VEGFR2 e ICAM-1).

2.2. Objetivos específicos

1. Avaliar a atividade antiparasitária da BthTX-I, em diferentes concentrações, contra a infecção por *T. gondii* em células BeWo *in vitro* por meio de ensaios de viabilidade e

proliferação celular do parasito, a fim de verificar se a toxina é capaz de reduzir a carga parasitária de maneira dose-dependente.

2. Selecionar proteínas-alvo do hospedeiro relevantes para a infecção por *T. gondii* (integrinas $\alpha 6\beta 1$ e $\alpha v\beta 3$, VEGFR2 e ICAM-1), com base em sua participação em processos de adesão, sinalização e transmigração celular, de forma a definir um conjunto de alvos plausíveis que possam mediar o efeito antiparasitário observado para a BthTX-I.
3. Recuperar as sequências das proteínas-alvo e da BthTX-I em formato FASTA e padronizar seus identificadores (UniProt/PDB/AlphaFold), com o objetivo de garantir a rastreabilidade dos dados e permitir o uso consistente dessas sequências em todas as etapas de análise bioinformática subsequentes.
4. Executar alinhamentos múltiplos de sequência e visualizar a conservação (Clustal Omega/pyMSAviz) para identificar motivos funcionais e regiões carregadas potencialmente envolvidas em interfaces proteína–proteína, visando reconhecer elementos estruturais relevantes para o funcionamento de cada alvo.
5. Realizar docking molecular (Boltz-2) entre BthTX-I e cada proteína-alvo, com o propósito de prever orientações de acoplamento e interfaces preferenciais de interação proteína–proteína que possam sustentar o efeito modulador da toxina.
6. Anotar as interfaces de contato com identificação de resíduos e tipos de interação (ligações de hidrogênio, pontes salinas, interações π /hidrofóbicas), a fim de caracterizar o modo de reconhecimento molecular e os principais determinantes estruturais envolvidos na formação de cada complexo.
7. Estimar a energia livre de ligação (PBEE – Protein Binding Energy Estimator) para cada complexo, ordenar as afinidades relativas e comparar essas tendências com os mapas de interação, com o objetivo de priorizar alvos com maior probabilidade de interação funcionalmente relevante com a BthTX-I.
8. Calcular e mapear os potenciais eletrostáticos (APBS/PyMOL) em painéis padronizados (visões 0°/180°), buscando correlacionar a complementaridade de

cargas entre BthTX-I e cada alvo com as regiões de interface propostas pelos modelos de docking, reforçando a plausibilidade físico-química das interações.

9. Conferir a coerência estrutural dos modelos obtidos com determinantes canônicos de cada alvo, com a finalidade de validar se os complexos propostos respeitam elementos estruturais críticos já descritos na literatura para o funcionamento dessas proteínas.
10. Integrar os achados *in silico* e os resultados celulares em um modelo mecanístico que relacione o acoplamento da BthTX-I a mecanismos de adesão e sinalização do hospedeiro com a restrição da infecção por *T. gondii*, de modo a propor uma explicação unificadora para o efeito antiparasitário observado e sugerir vias-alvo potenciais para estudos futuros.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Obtenção da BthTX-I

BthTX-I foi isolada a partir da peçonha de *Bothrops jararacussu* seguindo o protocolo descrito por Andrião-Escarso et al. (2000), com adaptações. Inicialmente, 200 mg de peçonha bruta foram dissolvidos em 1 mL de tampão bicarbonato de amônio (AMBIC) 0,05 M (NH_4HCO_3 , pH 7,8) e a suspensão foi centrifugada a $3000 \times g$ por 10 min a 4 °C. O sobrenadante clarificado foi então aplicado em coluna de CM-Sepharose Fast Flow previamente equilibrada (Cytiva Life Science, Brasil), sendo as proteínas eluídas a um fluxo de 0,1 mL/min, com coleta de frações de 1 mL por meio do coletor Radifrac (Amersham Bioscience, Brasil). A detecção das proteínas nas frações foi realizada a 280 nm no espectrofotômetro Ultrospec 1000 (Amersham Pharmacia Biotech, Brasil), e aquelas que continham BthTX-I foram reunidas, liofilizadas e armazenadas a -20 °C. A pureza da toxina foi avaliada por SDS-PAGE a 12,5%, conforme Laemmli (1970), utilizando-se marcadores de massa molecular de 116, 66,2, 45, 35, 25, 18,4 e 14,4 kDa para construção da curva padrão. A concentração de BthTX-I foi determinada pelo método de Bradford com kit comercial (Sigma). Imediatamente antes dos ensaios, a toxina era recém-solubilizada em PBS 1× na concentração desejada, sendo que o volume máximo de PBS 1× utilizado nos tratamentos corresponde a uma condição previamente caracterizada como segura e não citotóxica para células (Polloni et al., 2021).

3.2. Manutenção dos parasitos e células BeWo

A linhagem de trofoblasto humano BeWo foi mantida em condições padrão de cultura em meio Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 (Cultilab, Campinas, SP, Brasil), acrescido de 5% de soro fetal bovino (SFB; Cultilab), 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA). As células foram originalmente obtidas da American Type Culture Collection (ATCC, código CCL-98™, Manassas, VA, EUA). Considerando que o número de repiques influencia diretamente o comportamento das células em cultura, estabeleceu-se um controle rigoroso desse parâmetro. Assim, todas as etapas experimentais foram realizadas empregando-se apenas culturas dentro de um intervalo restrito de passagens, limitado a até 10 repiques, em concordância com o protocolo descrito por Liao et al. (2014). Os taquizoítos de *Toxoplasma gondii* (cepa RH, clone 2F1), que apresentam expressão constitutiva do gene da β-galactosidase, foram mantidos por meio de passagens seriadas em células BeWo. Para isso, utilizou-se meio RPMI 1640 suplementado com 2% de SFB, 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina. Tanto as culturas celulares quanto os parasitos foram incubados a 37 °C, em atmosfera umidificada com 5% de CO₂.

3.3. Ensaio de Viabilidade Celular

A viabilidade das células BeWo frente ao tratamento com a BthTX-I foi verificada usando o ensaio colorimétrico de MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide), seguindo o protocolo descrito por Teixeira et al., 2025. Células BeWo foram plaqueadas em 200 µL de meio RPMI 10% SFB em placas de 96 poços. Após 24 horas, as células foram tratadas em diluição seriada (1:2) com diferentes concentrações da toxina por 24 horas. Em seguida, as células foram incubadas com 10 µL de MTT numa concentração de 5 mg/mL, acrescido de 90 µL de meio RPMI 10% SFB durante 3 horas. Depois, os sobrenadantes foram removidos e os cristais de formazan solubilizados com 100 µL de solução com SDS 10% HCl (0,01 M). Por fim, foi feita leitura da densidade óptica (DO) a 570 nm em leitora de microplacas Multiskan SkyHigh Microplate Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific). A concentração necessária para reduzir pela metade a atividade das toxinas (IC₅₀) foi calculada a partir da curva concentração-resposta pelo software GraphPrad prism versão 6.0 (Inc., CA, EUA) (Teixeira, et al., 2021).

3.4. Ensaio de Proliferação de *T.gondii*

Células BeWo (3×10^4 células/200 μL /poço) foram plaqueadas em placas de cultura de 96 poços. Após 24 horas, as células foram infectadas com taquizoítos de *T. gondii* na proporção de 3 parasitos por célula (3:1) em meio RPMI 2% SFB por 3 horas. Em seguida, as células foram lavadas com meio de cultura incompleto (sem SFB) para remoção dos parasitos extracelulares, seguido do tratamento em diluição seriada com concentrações não citotóxicas da BthTX-I durante 24 horas. A proliferação intracelular foi analisada por meio do ensaio colorimétrico de β -galactosidase, com leitura da OD a 570 nm. A proliferação intracelular de *T. gondii* (número de taquizoítos) foi obtida de acordo com uma curva de referência contendo taquizoítos livres (de 1×10^6 a $15,6 \times 10^3$). Os dados foram expressos como porcentagem (%) da proliferação de *T. gondii*, sendo que a média do número de taquizoítos do controle positivo de crescimento do parasito (células infectadas e não tratadas) correspondeu a 100% de proliferação do parasito. A eficiência de cada condição de tratamento foi mensurada em comparação ao controle positivo (100% de proliferação) (Oliveira, et al., 2025).

3.5. Seleção das proteínas de interesse

A seleção dos alvos moleculares foi realizada a partir de um levantamento sistemático em recursos especializados de genômica e biologia de *T. gondii*, com exploração de genes, anotações funcionais e vias no ToxoDB/EuPathDB (Gajria et al., 2008). Para priorizar processos do hospedeiro modulados na infecção (adesão, migração/transmigração e angiogênese), foi conduzido mapeamento e anotação nas bases de vias validadas Reactome e KEGG (Milacic et al., 2024; Kanehisa et al., 2023). As descrições e identificadores das proteínas humanas selecionadas, bem como metadados de sequência, foram obtidos no UniProt (Universal Protein Resource), assegurando padronização terminológica (The UniProt Consortium, 2023). Além disso, foi realizada triagem bibliográfica em bases indexadoras utilizando descritores combinados e priorizando publicações das duas últimas décadas (Sayers et al., 2022).

3.6. Recuperação das sequências FASTA das proteínas de interesse e da BthTX-I

As sequências primárias das proteínas humanas alvo (subunidades de integrinas $\alpha 6/\beta 1$, $\alpha V/\beta 3$, ICAM-1 e VEGFR2) foram obtidas no UniProtKB, selecionando-se sempre a isoforma canônica de entradas *reviewed*/Swiss-Prot e fazendo o *download* em formato FASTA (The UniProt Consortium, 2023). Para cada proteína, registraram-se os identificadores UniProt e conferiram-se metadados básicos (organismo, evidência experimental) para padronização da nomenclatura.

A concordância entre as sequências e as estruturas empregadas nas análises estruturais foi verificada no RCSB-PDB (Research Collaboratory for Structural Bioinformatics Protein Data Bank), utilizando os registros SEQRES e anotações de cadeia/cobertura para os códigos 3VI4, 1L5G, 7CEC, 3V2A e 3HZD (Burley et al., 2021). Nos casos em que apenas o ectodomínio se encontrava resolvido (integrinas e VEGFR2), a sequência canônica completa foi mantida para análises baseadas em sequência, registrando-se a região efetivamente coberta pelos dados cristalográficos (Burley et al., 2021; The UniProt Consortium, 2023).

Para ICAM-1, além da sequência canônica UniProt (P05362), foi consultado o modelo AlphaFold AF-P05362-F1 para verificar a correspondência entre limites de domínio previstos e a sequência utilizada (Jumper et al., 2021; Varadi et al., 2022). A sequência de BthTX-I foi extraída do registro SEQRES do PDB 3HZD e conferida quanto a comprimento e motivo Lys49-PLA₂ (Burley et al., 2021). Todas as sequências FASTA foram inspecionadas quanto à integridade (ausência de caracteres inválidos, comprimento esperado) e armazenadas com registro de data de acesso.

3.7. Alinhamento de sequências e visualização (Clustal Omega + pyMSAviz)

Os alinhamentos múltiplos de sequências foram obtidos com o Clustal Omega no servidor web do EMBL-EBI (European Molecular Biology Laboratory – European Bioinformatics Institute), usando um arquivo FASTA único contendo BthTX-I e os alvos humanos (integrinas $\alpha 6$, αV , $\beta 1$, $\beta 3$, VEGFR2 e ICAM-1), mantendo os parâmetros padrão do serviço e exportando as saídas nos formatos CLUSTAL (.aln) e FASTA alinhado (.fasta) (Sievers et al., 2011; Madeira et al., 2024). As regiões analisadas foram restringidas aos domínios

extracelulares com base nas anotações canônicas do UniProt, e, no caso de ICAM-1, também no modelo AF-P05362-F1 do AlphaFold (The UniProt Consortium, 2023; Jumper et al., 2021; Varadi et al., 2022).

A visualização e anotação dos MSAs (multiple sequence alignment) foram realizadas no pacote pyMSAviz (Python), destacando motivos e resíduos de interesse a partir do arquivo .aln gerado pelo Clustal Omega (moshi4/pyMSAviz, 2022–2024). A partir do mesmo alinhamento, foi calculada uma matriz de identidade par-a-par com Biopython, e os resultados foram representados em formato de heatmap (Cock et al., 2009). As Figuras finais foram exportadas em PNG (Portable Network Graphics) (300–600 dpi) e SVG (Scalable Vector Graphics) para montagem de painéis.

3.8. Docking molecular (Boltz-2)

Os complexos proteína–proteína entre a BthTX-I e os alvos humanos foram preditos com o modelo fundacional Boltz-2 (<https://boltz.bio/boltz2>), que realiza co-modelagem estrutural e estima afinidade de ligação a partir das estruturas previstas (Passaro et al., 2025). As execuções foram realizadas em ambiente Google Colab com GPU (graphics processing unit) TESLA T4, seguindo o pipeline oficial do repositório (clonagem, instalação e uso do comando boltz predict) e empregando arquivos FASTA multissequência contendo as cadeias da toxina e de cada alvo (Wohlwend et al., 2025). Para maximizar informação evolutiva, foi habilitada a construção remota de MSA (--use_msa_server), que utiliza o ColabFold (Google Colaboratory–based implementation of AlphaFold/AlphaFold-Multimer) e buscas MMseqs2 (Many-against-Many sequence searching version 2) (Mirdita et al., 2022), e, nas rotinas de afinidade, aplicou-se a correção por massa molecular (--affinity_mw_correction), conforme descrito no preprint do modelo (Passaro et al., 2025). O módulo de afinidade do Boltz-2, baseado em uma arquitetura PairFormer, gerou probabilidades de ligação e valores de afinidade a partir das estruturas de maior ipTM (interface predicted TM-score - AlphaFold-Multimer interface confidence metric) em cada conjunto de predições. Todos os arquivos de saída (estruturas, escores e logs) foram armazenados integralmente para garantir rastreabilidade e reprodutibilidade das análises (Wohlwend et al., 2025; Passaro et al., 2025).

3.9. Cálculo da energia livre de ligação (PBEE)

A energia livre de ligação (ΔG) dos complexos BthTX-I+alvos foi estimada com o PBEE (Protein Binding Energy Estimator - <https://github.com/chavesejf/PBEE>), ferramenta em Python que combina descritores energéticos do Rosetta com modelos de *machine learning* (Chaves et al., 2025; PBEE GitHub). Para cada complexo proteína–proteína (BthTX-I com $\alpha 6\beta 1$, $\alpha v\beta 3$, VEGFR2 e ICAM-1), utilizou-se a estrutura predita na etapa anterior como entrada, executando o fluxo interno do PBEE que gera descritores baseados na função de energia do Rosetta e aplica o modelo de regressão disponibilizado (versão v1.1) para calcular ΔG em kcal·mol⁻¹ (Alford et al., 2017; Chaves et al., 2025). Os arquivos de saída (descritores e previsões de ΔG) foram organizados no diretório pbee_outputs/, garantindo possibilidade de reanálise (PBEE GitHub).

3.10. Visualização e análise de interações moleculares dos complexos proteína-proteína (PyMOL e Discovery Studio Visualizer)

Os complexos BthTX-I+alvos preditos foram analisados no PyMOL para conferência de topologia, identificação de cadeias e caracterização da interface, incluindo medições de distâncias/ângulos e SASA (solvent-accessible surface area) por resíduo com o comando *get_area* (algoritmo de Shrake–Rupley) (DeLano, 2002; Shrake & Rupley, 1973). As regiões extracelulares das proteínas hospedeiras foram delimitadas com base nas anotações de topologia/domínios do UniProt (The UniProt Consortium, 2023). Em paralelo, os mesmos complexos foram avaliados no BIOVIA Discovery Studio Visualizer para levantamento sistemático de interações de interface (pontes de hidrogênio, interações iônicas, hidrofóbicas e aromáticas), com exportação das tabelas de contato em formato .TSV (tab-separated values - tabular text file format) para análise posterior (BIOVIA/3DS, Discovery Studio Visualizer). A interpretação das pontes de hidrogênio considerou critérios geométricos clássicos de distância e ângulo descritos por McDonald & Thornton (1994), e todas as medições foram organizadas por complexo e cadeia, mantendo consistência com a numeração dos arquivos PDB e com as tabelas de interações.

3.11. Geração de imagens de qualidade (PyMOL)

A renderização das Figuras foi realizada no PyMOL, adotando fundo branco e espaço de cor CMYK (cyan, magenta, yellow and key black color space), com desativação de névoa (`depth_cue`, `ray_trace_fog`) e aplicação de anti-aliasing para maximizar nitidez em padrão de impressão (PyMOL Documentation; PyMOLWiki). Os complexos foram exibidos em cartoon (visão global) e em zoom da interface com resíduos de contato em sticks, extraídos a partir da lista de interações do Discovery Studio e coloridos por tipo de átomo, adicionando-se medidas de distância entre pares relevantes com o comando *distance*. Para cada complexo, foram gerados ao menos dois ângulos de visualização (0° e 180°) e cenas específicas destacando ligações de hidrogênio, interações salinas e interações π/π , mantendo paleta e rótulos consistentes. As imagens finais foram exportadas por ray tracing em formato PNG, com DPI (dots per inch) entre 300 e 4000, utilizando combinações padrão dos comandos `ray` e `png` adequadas para submissão em periódicos científicos (PyMOL Documentation; PyMOLWiki).

3.12. Visualização de superfície eletrostática (APBS Electrostatics Plugin)

A visualização das superfícies eletrostáticas dos complexos proteína–proteína foi realizada no PyMOL por meio do plugin APBS Electrostatics, que integra o solucionador APBS para cálculo do potencial eletrostático via equação de Poisson–Boltzmann (Jurrus et al., 2017; PyMOLWiki, 2023). Os cálculos foram executados pela interface do plugin, gerando mapas de potencial em formato OpenDX (Open Data Explorer format - .dx volumetric data file) e mapeando-os diretamente sobre a superfície dos complexos. As Figuras foram padronizadas com a escala azul–branco–vermelho (azul = potencial positivo; vermelho = negativo), mantendo o mesmo intervalo de valores entre os diferentes alvos. Para reprodutibilidade, os arquivos de entrada do APBS e os mapas .dx foram salvos para cada complexo, e as imagens finais foram exportadas em PNG/SVG seguindo o mesmo procedimento de renderização adotado para as demais figuras estruturais.

4. RESULTADOS

4.1. Obtenção da BthTX-I

A aplicação da peçonha bruta de *Bothrops jararacussu* na coluna de CM-Sepharose Fast Flow resultou em uma separação eficiente dos componentes proteicos, permitindo a obtenção de um pico bem definido correspondente à BthTX-I. Esse pico foi eluído apenas na etapa de maior força iônica do gradiente, em 100% do tampão mais concentrado (AMBIC 0,5 M) pH 7,8 (Figura 1). Posteriormente, a fração coletada foi liofilizada e submetida a avaliação de sua pureza por SDS-PAGE a 12,5%, revelando uma única banda proteica, próxima a massa molecular descrita para BthTX-I ($\approx 13,7$ kDa), indicando homogeneidade da amostra (Figura 1). A concentração da toxina foi então determinada pelo método de Bradford, possibilitando o ajuste preciso das doses empregadas nos ensaios funcionais subsequentes.

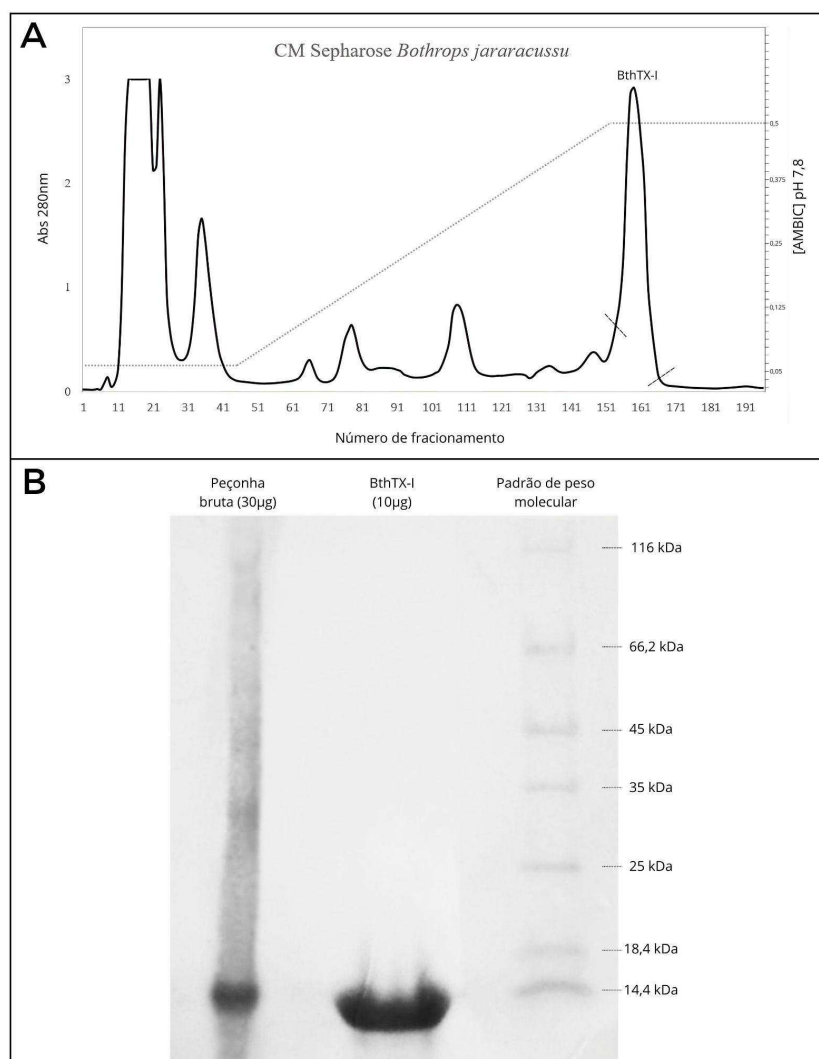


Figura 1. Perfil cromatográfico de purificação e SDS-PAGE 12,5% da fração relativa à BthTX-I. (A) 200mg da peçonha bruta de *B.jararacussu* foi aplicada em coluna de troca catiônica CM Sepharose Fast Flow. A eluição foi realizada com gradiente do tampão AMBIC de 0,05 a 0,5M, em pH 7,8 e absorbâncias lidas em 280nm. (B) Análise de pureza da fração de BthTX-I após purificação. Colunas representam Peçonha bruta de *Bothrops jararacussu* (30µg), fração de BthTX-I coletada na purificação (10µg) e Padrão de massa molecular (14,4 kDa a 116 kDa), respectivamente.

4.2. Ensaio de Viabilidade celular

A viabilidade das células trofoblásticas BeWo expostas à BthTX-I por 24 h foi avaliada pelo ensaio de MTT (OLIVEIRA et al., 2025). As células foram tratadas com concentrações crescentes da toxina (0,78–100 µg/mL), utilizando-se como controle o grupo mantido apenas em meio de cultura, considerado 100% viável. No intervalo de 0,78 a 12,5 µg/mL, a BthTX-I não promoveu perda relevante de viabilidade celular, que se manteve em torno de 80–90%, sem diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle. Em contraste, as maiores concentrações testadas reduziram de forma significativa a viabilidade das células: $73,4 \pm 4,6\%$ em 50 µg/mL ($n = 7$; $p < 0,01$ vs. controle) e $61,6 \pm 2,8\%$ em 100 µg/mL ($n = 7$; $p < 0,0001$), conforme apresentado na Figura 2. Com base nesses dados, as concentrações $\leq 12,5$ µg/mL foram consideradas como faixa não citotóxica de BthTX-I para células BeWo.

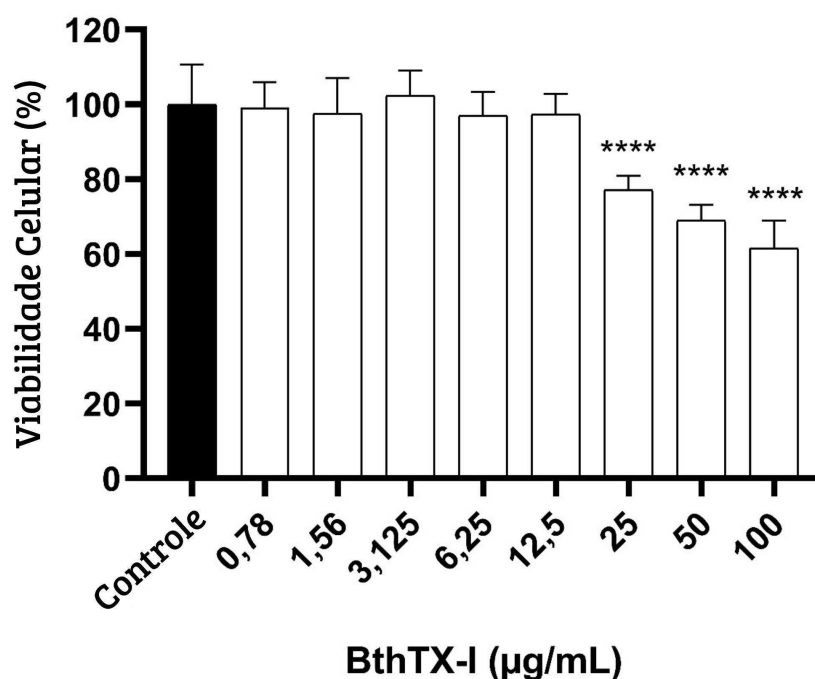


Figura 2. Viabilidade celular (MTT) de BeWo após 24 h de exposição à BthTX-I. Barras = média $\pm$ DP; Controle normalizado para 100%. Símbolos de significância vs. controle: $p < 0,01$, **** $p < 0,0001$ (ANOVA uma via seguida de comparações múltiplas vs. controle).

4.3 Seleção dos alvos moleculares

A partir da triagem bibliográfica realizada, foram inicialmente levantadas diversas proteínas do hospedeiro envolvidas em processos de adesão, sinalização e transmigração celular potencialmente relevantes para a infecção por *T. gondii*. Nessa etapa, foram considerados como principais critérios a participação documentada em mecanismos de interação célula–célula ou célula–matriz relacionados à invasão ou disseminação de patógenos, a expressão em tipos celulares de interesse para o estudo da toxoplasmose, em especial em contextos de barreiras epiteliais e endoteliais e a consistência das evidências entre diferentes estudos e bases de dados consultadas.

Aplicando esses critérios, foram selecionadas as integrinas $\alpha 6\beta 1$ e $\alpha v\beta 3$, a molécula de adesão ICAM-1 e o receptor tirosina-quinase VEGFR2, por apresentarem maior consistência entre as fontes consultadas para os processos-alvo definidos. As integrinas $\alpha 6\beta 1$ e $\alpha v\beta 3$ destacaram-se pela recorrência de seu envolvimento em interações com componentes da matriz extracelular e na regulação de vias de sinalização associadas à adesão e migração celular, alinhadas ao cenário de invasão tecidual por *T. gondii*. A ICAM-1 foi selecionada por seu papel em interações de adesão célula–célula mediadas por leucócitos e por sua participação em processos inflamatórios e de transmigração, potencialmente moduláveis pela BthTX-I. Por fim, o VEGFR2 foi selecionado em função de sua posição central em vias de sinalização pró-angiogênicas e de sobrevivência celular, que podem influenciar a resposta do hospedeiro frente à infecção.

4.4. Ensaio de Proliferação de *T. gondii*

A atividade antiparasitária da BthTX-I foi avaliada em células BeWo infectadas com taquizoítos LacZ de *T. gondii*, por meio do ensaio colorimétrico de β -galactosidase, expressando-se os resultados como porcentagem de proliferação em relação ao controle infectado e não tratado (100%) (OLIVEIRA et al., 2025). A toxina reduziu de forma significativa a proliferação do parasito em todas as concentrações testadas ($p < 0,05$ vs.

controle), com perfil claramente dependente da dose (Figura 3). Nas concentrações consideradas não citotóxicas pelo MTT (0,78–25 µg/mL), a proliferação intracelular foi reduzida em torno de 55–75% em relação ao controle. Concentrações superiores promoveram inibição adicional, com proliferação abaixo de 25% relação ao controle, representando a faixa citotóxica observada no ensaio de viabilidade celular.

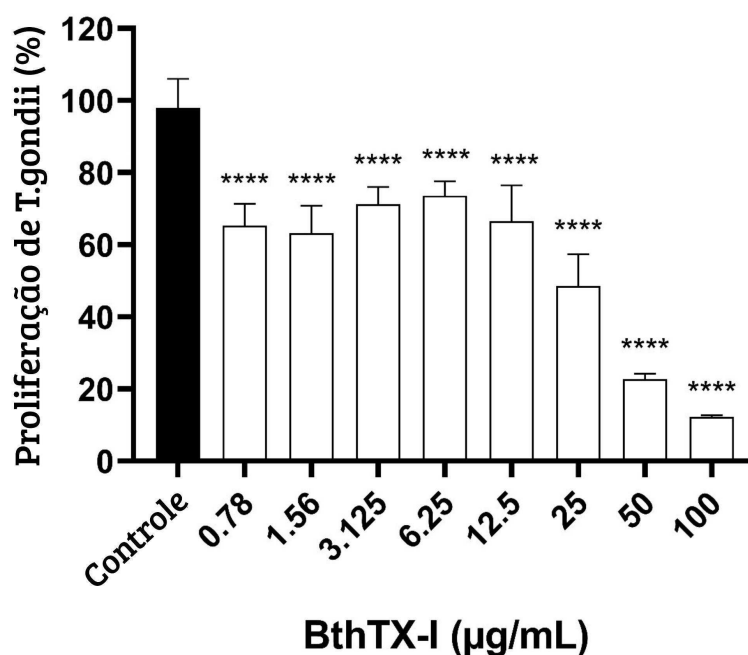


Figura 3. Proliferação de *T. gondii* (β-galactosidase) após 24 h de tratamento com BthTX-I. Barras = média ± DP; controle infectado normalizado para 100%. Símbolos indicam diferença vs. controle (**** corresponde a $p < 0,0001$). ANOVA uma via + comparações múltiplas vs. controle.

4.5. Alinhamento entre BthTX-I e alvos moleculares

O alinhamento múltiplo (MSA) foi gerado no Clustal Omega a partir de um arquivo FASTA único contendo a sequência de BthTX-I (extraída do registro SEQRES do PDB 3HZD) e os domínios extracelulares dos alvos selecionados ($\alpha 6$, αV , $\beta 1$, $\beta 3$, VEGFR2 e ICAM-1). Os parâmetros do serviço *web* do EMBL-EBI foram mantidos nos padrões do Clustal Omega, e os resultados foram exportados em formato CLUSTAL e FASTA alinhado, já a visualização e marcação do MSA foram realizadas com o pyMSAviz. A matriz de identidade par-a-par foi calculada a partir do MSA e representada como heatmap (Figura 4). Ademais, é notável baixa

similaridade global de VEGFR2 com demais proteínas do painel: identidades na faixa de 14,9–34,7% quando comparado aos demais (menor com α V: 14,9%; com β 3: 23,1%).

Além da matriz de identidade, o MSA foi exportado pelo PyMSAviz com trilhas que mostram posições/resíduos conservados e faixas contínuas correspondentes aos principais domínios funcionais das proteínas analisadas. As anotações foram baseadas nos limites de domínio extracelular obtidos das entradas canônicas do UniProt e, no caso de ICAM-1, conferidos também com o modelo AlphaFold AF-P05362-F1, nesse sentido, o procedimento de visualização/rotulagem seguiu o fluxo descrito na metodologia (importação do .aln do Clustal Omega e renderização com controle de paleta, rótulos e faixas) (Figura 5). Além disso, durante o MSA, não foram observados resíduos conservados de BthTX-I em alinhamento com os domínios relevantes dos alvos proteicos de interesse, justificando sua ausência representativa na Figura 4 e 5.

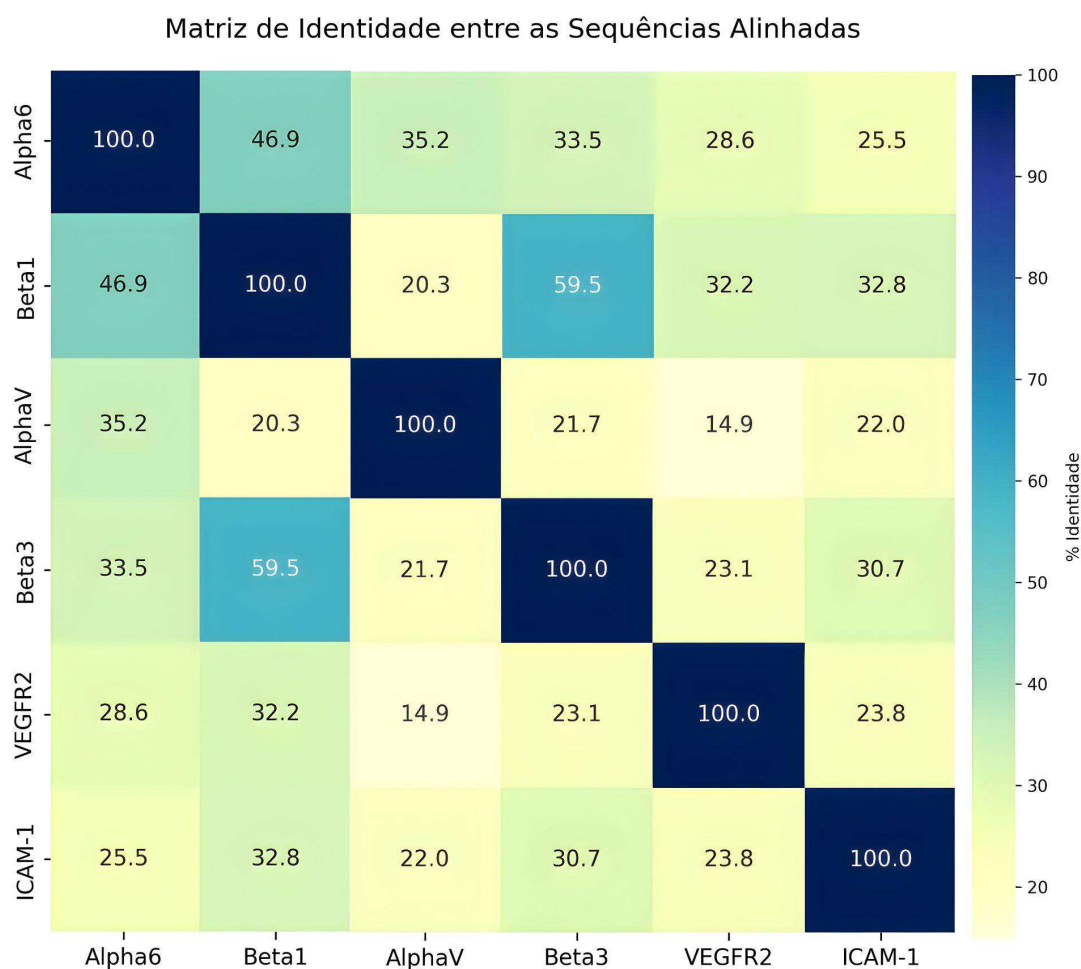


Figura 4. Matriz de Identidade (Heatmap) entre alvos proteicos alinhados (% identidade). Cores mais escuras indicam maior identidade (0–100%). Diagonal principal = 100%.

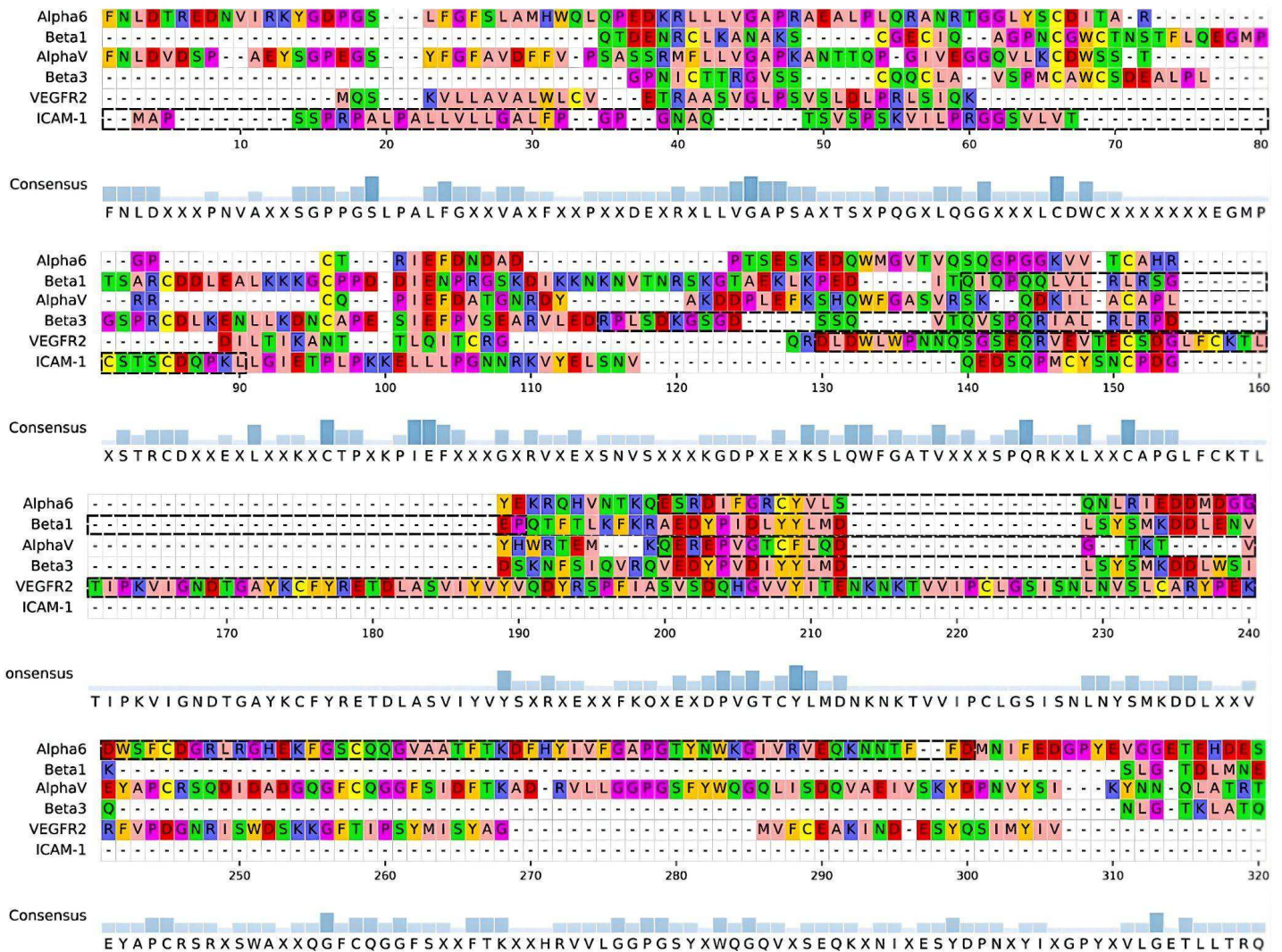


Figura 5. Alinhamento múltiplo de seqüências (PyMSAviz) dos ectodomínios de α6, β1, αV, β3, VEGFR2 e ICAM-1, gerado no Clustal Omega (EMBL-EBI) e exportado/rotulado no PyMSAviz. A Figura mostra, para cada posição, a coloração por tipo de aminoácido, o histograma de consenso abaixo dos alinhamentos (frequência relativa do resíduo mais comum) e trilhas adicionais com as faixas funcionais anotadas. Os intervalos destacados correspondem às seguintes regiões: β3 domínio βI/I-like (loop MIDAS/ADMIDAS), 115–160; β1 domínio βI/I-like (MIDAS), 140–190; α6 β-propeller (ligação à laminina), 200–300; αV headpiece/β-propeller (reconhecimento de RGD [arginine–glycine–aspartic acid]

motif]), 200–240; VEGFR2 domínios D2–D3 (interface para VEGF-A [vascular endothelial growth factor A]), 130–240; ICAM-1 Domínio 1 - epítipo para LFA-1 (lymphocyte function-associated antigen 1), 1–90.

4.6. *Docking* molecular, interações identificadas e visualizações tridimensionais

A interação entre a BthTX-I e os alvos moleculares ($\alpha 6\beta 1$, $\alpha v\beta 3$, VEGFR2 e ICAM-1) foi predita utilizando o modelo Boltz-2. Como saída o modelo fornece valores de pTM (confiabilidade na topologia geral do complexo predito), ipTM (sumariza a confiança na orientação entre as cadeias das proteínas) e *Confidence Score*, calculado pela métrica composta ($0,8 \cdot \text{ipTM} + 0,2 \cdot \text{pTM}$) amplamente empregada para o ranqueamento de predições multímeras. Nesse contexto, considera-se que valores de *Confidence Score* superiores a 0,8 normalmente indicam interações previstas com alta confiança, valores entre 0,6 e 0,8 indicam boa confiança e resultados abaixo de 0,6 indicam baixa confiança na predição do complexo. Sendo assim, os resultados de predição referentes a interação da toxina com os alvos celulares selecionados estão apresentados na Figura 6, onde os complexos formados entre a BthTX-I e as integrinas se destacam por terem recebido os maiores valores de *Confidence Score*, evidenciando alta confiabilidade nas interações previstas de acordo com os índices gerados pelo modelo. As estruturas tridimensionais dos complexos são apresentadas nas subseções posteriores.

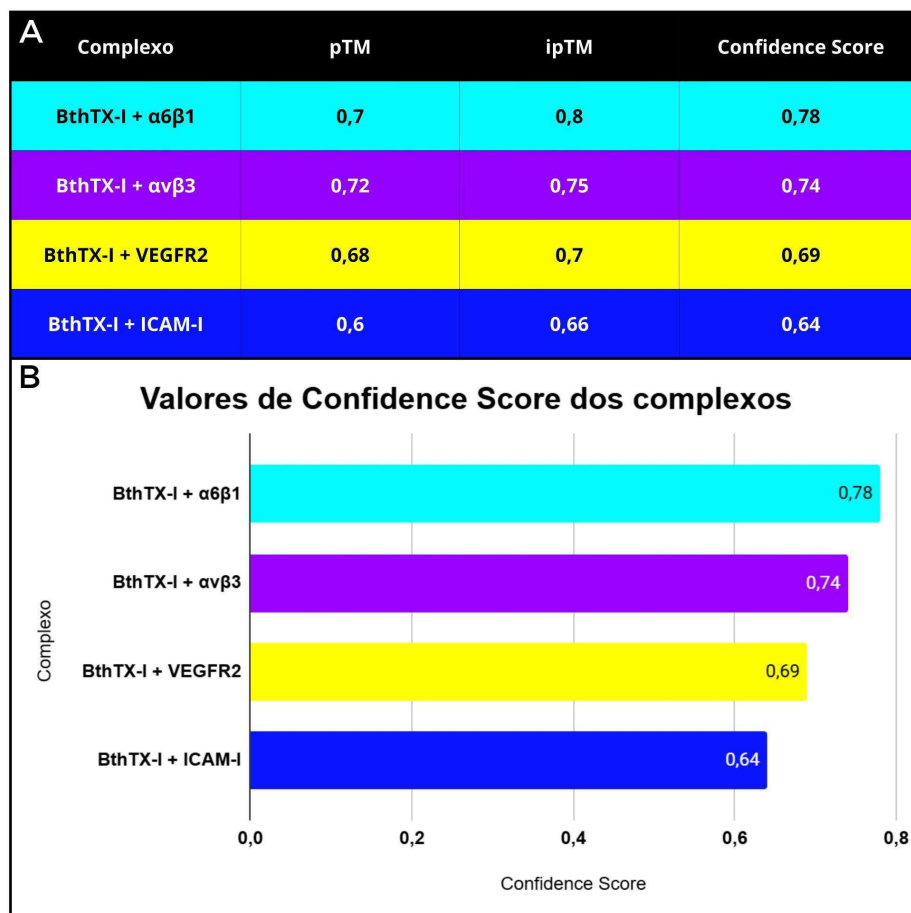


Figura 6. Valores de pTM, ipTM e *Confidence Score* preditos pelo Boltz-2 para os complexos de BthTX-I e os alvos moleculares selecionados. (A) tabela representativa dos índices preditos pelo modelo. (B) gráfico comparativo entre os valores de *Confidence Score* para cada complexo gerado.

4.6.1. BthTX-I + $\alpha 6\beta 1$

A interação entre BthTX-I e a $\alpha 6\beta 1$ foi predita utilizando o modelo Boltz-2, o qual gerou um complexo tridimensional da ligação entre as duas moléculas. A Figura 7 apresenta três representações geradas no PyMOL a partir do complexo predito pelo modelo. (A) uma visão global do complexo em orientação de 0°, destacando o posicionamento relativo entre BthTX-I e o headpiece de $\alpha 6$; (B) a visão complementar a 180°, evidenciando a continuidade do encaixe entre as superfícies moleculares; e (C) um painel detalhado da interface com os resíduos de contato representados em *sticks* e diferenciados por cadeia, permitindo a avaliação da contiguidade e complementaridade da superfície de interação. As imagens foram produzidas de acordo com os parâmetros previamente descritos (Seção 3.9).



Figura 7. Representações em cartoon e em sticks do complexo BthTX-I e a $\alpha 6\beta 1$. (A) Painel 0°. (B) Painel 180°. (C) Detalhe da interface prevista pelo docking, mostrando BthTX-I em verde-claro, $\alpha 6$ em ciano e $\beta 1$ em rosa. Linhas pontilhadas indicam: amarelo = ligações polares, laranja = pontes salinas, vermelho = interações π ; valores ao lado indicam distâncias (Å). Átomos de nitrogênio em azul-escuro e de oxigênio em vermelho-claro.

4.6.3. BthTX-I + $\alpha v\beta 3$

Já para o complexo toxina + $\alpha v\beta 3$ (Figura 8), gerado pelo modelo Boltz-2, a interface de interação evidencia os resíduos Glu21, Lys80, Glu96, Lys99, Glu107, Arg106, Lys125, Lys126, Gly110, Gly186 e Asn209 de BthTX-I em contato direto com a cadeia αv . Na subunidade αv , os resíduos de contato incluíram Arg220, Tyr263, Phe/Tyr265, Asn269, Ser272, Leu273, Asp824, Asp826, Glu836 e Arg841. Esses contatos se distribuem entre a região do β -propeller N-terminal e porções mais distais da subunidade αv , formando uma interface carregada que coloca resíduos básicos da BthTX-I interagindo com resíduos ácidos da integrina.

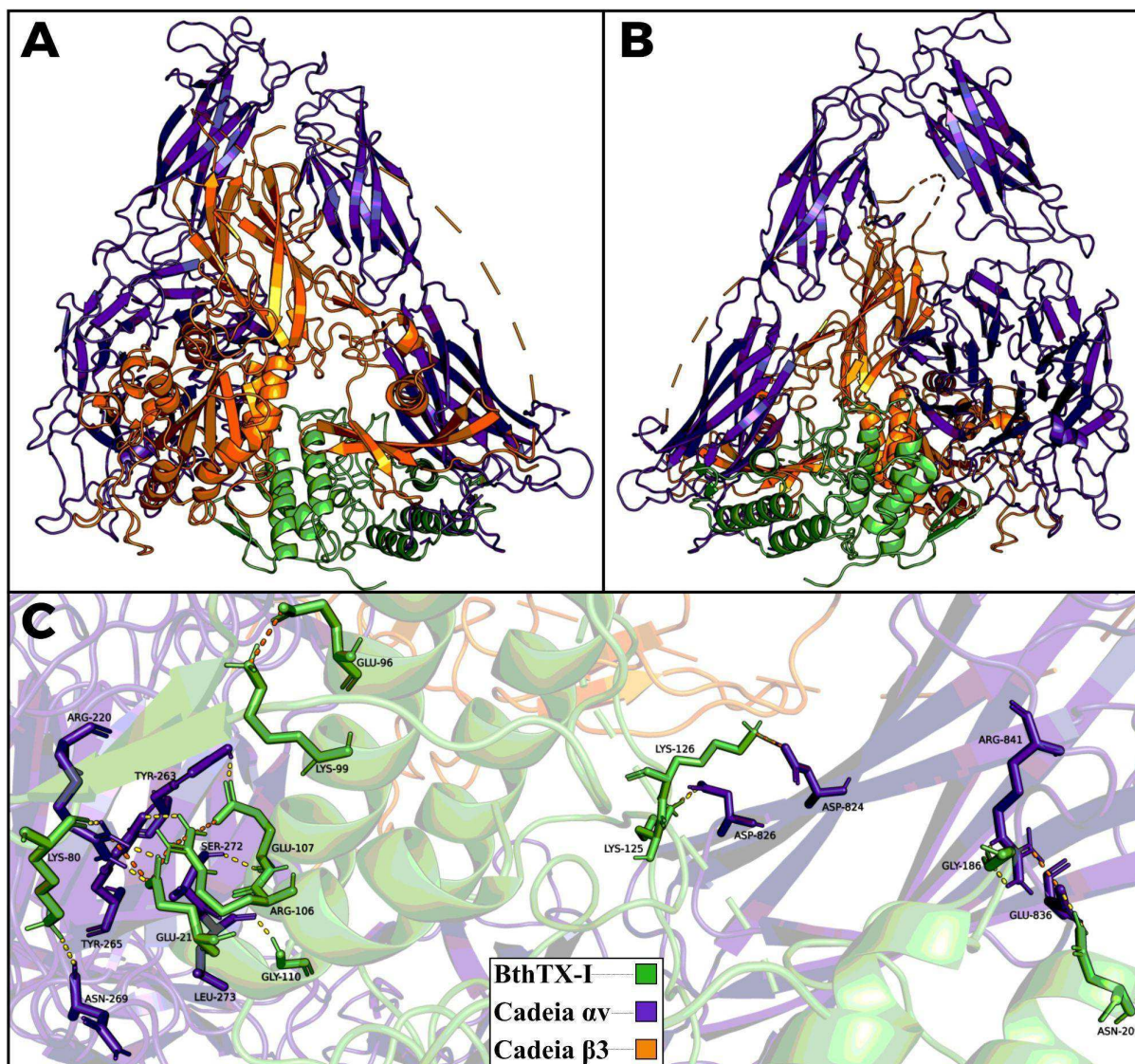


Figura 8. Representações em cartoon e em sticks do complexo BthTX-I e a $\alpha v\beta 3$. (A) Painel 0°. (B) Painel 180°. (C) Detalhe da interface prevista pelo docking, mostrando BthTX-I em verde-claro, αv em roxo e $\beta 3$ em laranja. Linhas pontilhadas indicam: amarelo = ligações polares, laranja = pontes salinas, vermelho = interações π ; valores ao lado indicam distâncias (Å). Átomos de nitrogênio em azul-escuro e de oxigênio em vermelho-claro.

4.6.4. BthTX-I + VEGFR2

O complexo BthTX-I+VEGFR2 foi igualmente predito no Boltz-2 (Figura 9). A inspeção detalhada da interface indicou que, na BthTX-I, os resíduos Ser1, Lys7, Gln11, Glu12, Lys19, Glu87, Asp70, Trp68, Tyr66, Lys71, Lys90, Glu98, Asn99, Arg97, Lys105, Arg108, Lys112, Tyr103 e Glu98 participam do contato direto com VEGFR2. No receptor, os resíduos envolvidos incluíram Lys4, Leu7, Val9, Glu16, Thr98, Tyr115, Gln132, His133, Arg164,

Glu167, Glu201, Asp206 e Arg169. Esses contatos se distribuem ao longo da região N-terminal de VEGFR2, compondo uma interface composta por pares de cargas complementares e interações aromáticas.

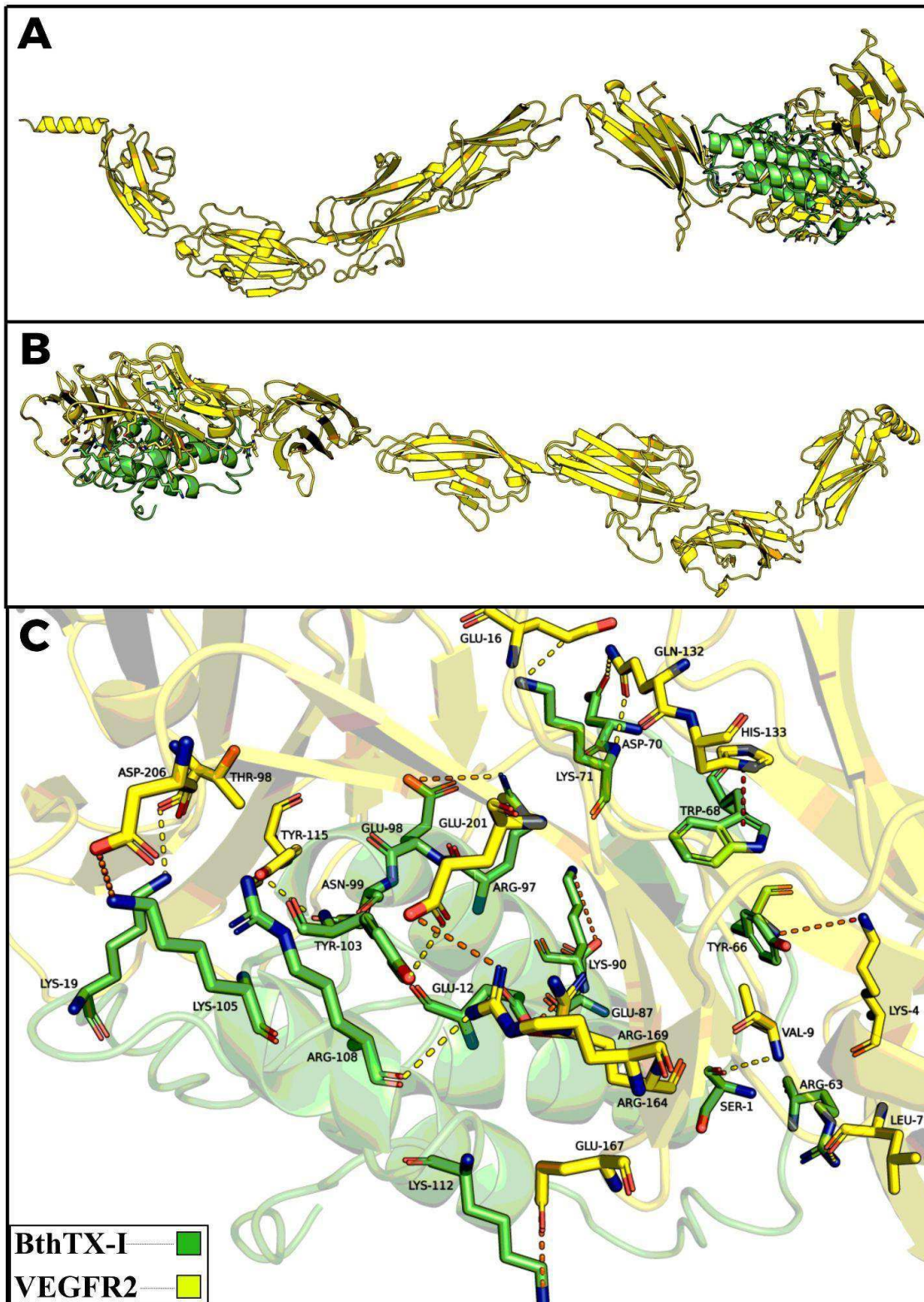


Figura 9. Representações em cartoon e em sticks do complexo entre BthTX-I e VEGFR2. (A) Painel 0°. (B) Painel 180°. (C) Detalhe da interface prevista pelo docking, mostrando BthTX-I em verde-claro e VEGFR2 em amarelo. Linhas pontilhadas indicam: amarelo = ligações polares, laranja = pontes salinas, vermelho = interações π ; valores ao lado indicam distâncias (Å). Átomos de nitrogênio em azul-escuro e de oxigênio em vermelho-claro.

4.6.5. BthTX-I + ICAM-1

Por fim, a predição do complexo BthTX-I e ICAM-1 (Figura 10), realizada no Boltz-2, indicou que, na toxina, os resíduos Lys7, Gln11, Glu12, Trp68, Tyr66 e Lys71 compõem o conjunto de contatos diretos com ICAM-1. No alvo, foram identificados os resíduos Glu363, Asp364, Asp399, Glu400, Arg367 e Arg401 na região de contato. Essa interface é caracterizada por pares de resíduos básicos da BthTX-I interagindo com resíduos ácidos de ICAM-1.

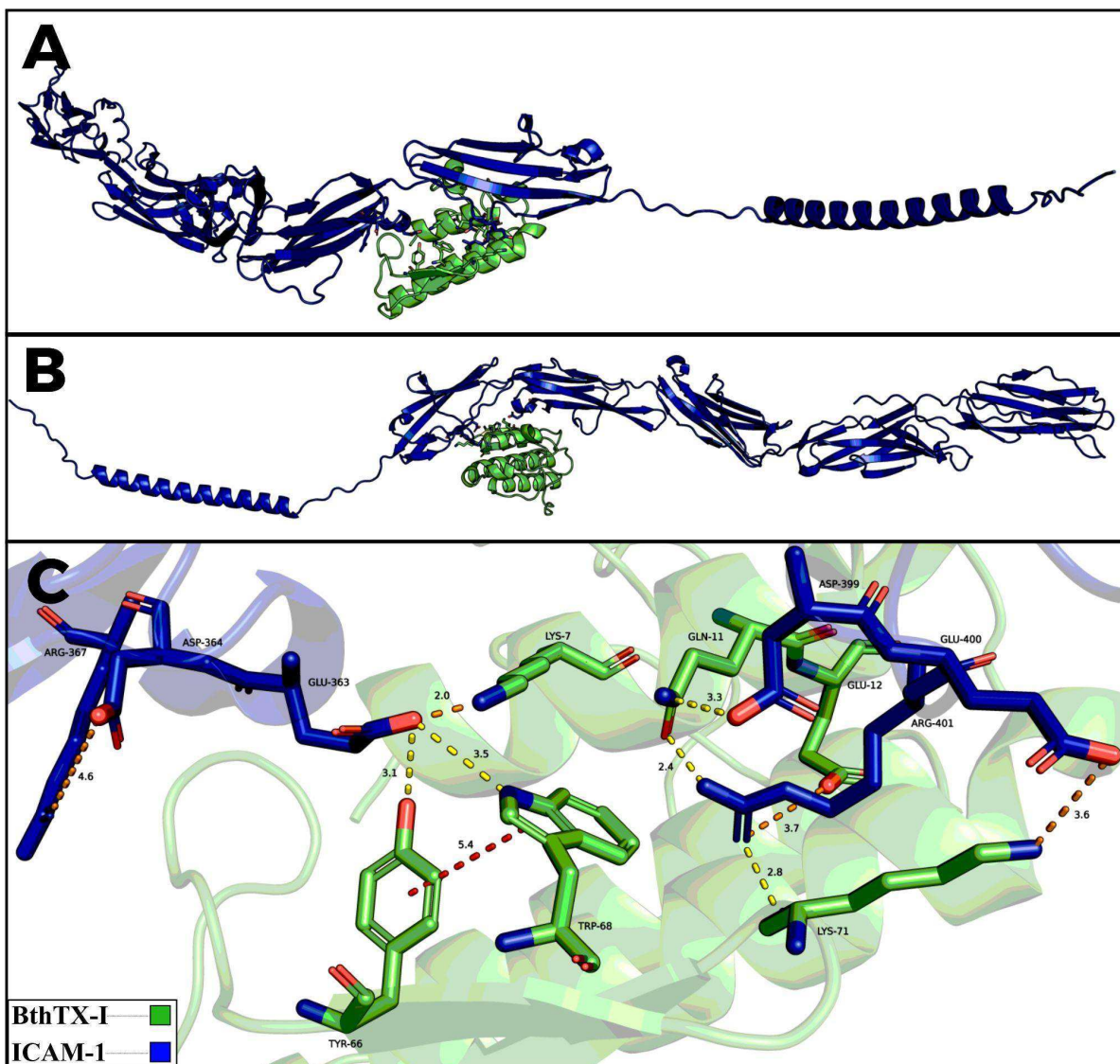


Figura 10. Representações em cartoon e em sticks do complexo entre BthTX-I e ICAM-1. (A) Painei 0°. (B) Painei 180°. (C) Detalhe da interface prevista pelo docking, mostrando BthTX-I em verde-claro e ICAM-I em azul escuro. Linhas pontilhadas indicam: amarelo = ligações polares, laranja = pontes salinas, vermelho = interações π ; valores ao lado indicam distâncias (Å). Átomos de nitrogênio em azul-escuro e de oxigênio em vermelho-claro.

4.7. Visualização de superfície eletrostática (APBS Electrostatics Plugin)

Com o objetivo de inspecionar complementaridade de cargas nas interfaces previstas pelos dockings, calculamos e mapeamos o potencial eletrostático (solução de Poisson–Boltzmann) (Figuras 11-14) dos complexos, BthTX-I + $\alpha 6\beta 1$ (Figura 7), BthTX-I + $\alpha v\beta 3$ (Figura 8),

BthTX-I + VEGFR2 (Figura 9) e BthTX-I + ICAM-1 (Figura 10) no PyMOL por meio do APBS Electrostatics Plugin a 298K. As superfícies foram coloridas em vermelho (-5 kT/e) a azul ($+5$ kT/e), com duas vistas por complexo (0° e 180°), mantendo a mesma orientação relativa usada nas Figuras estruturais anteriores. Essa estratégia permite avaliar, de maneira qualitativa, se as regiões de contato propostas pelos modelos exibem atração eletrostática plausível (Jurrus *et al.*, 2018; Baker *et al.*, 2001; Dolinsky *et al.*, 2004; DeLano, 2002).

Nos quatro complexos, observou-se um aglomerado de cargas na superfície de BthTX-I, com regiões catiônicas em destaque, coerentes com a região C-terminal básica típica das PLA₂ Lys49, voltadas para áreas predominantemente aniônicas do alvo, compatíveis com reconhecimento inicial dirigido por eletrostática (Lomonte & Rangel, 2012; Zambelli *et al.*, 2017; Borges *et al.*, 2023). Para $\alpha 6\beta 1$ (Figura 11), as superfícies indicam regiões aniônicas no topo do receptor, onde ancora por coordenação ao MIDAS (metal-ion-dependent adhesion site) de $\beta 1$, recebendo uma cargas positivas da toxina. Tal padrão é condizente com o modo de ligação bipartido de $\alpha 6\beta 1$ a laminina (Arimori *et al.*, 2021). No caso de $\alpha v\beta 3$ (Figura 12), nota-se uma região negativa contínua ao redor da região de reconhecimento ao motivo RGD no domínio $\beta I/\beta$ -propeller, frente à qual BthTX-I exibe pontos azuis intensos nas duas vistas, concordando com a topologia eletronegativa do sítio observada em cristalografia (Xiong *et al.*, 2002). Para VEGFR2 (Figura 13), a face básica da BthTX-I se orienta contra uma faixa aniônica localizada nos domínios D2–D3, coincidindo parcialmente com a interface descrita para o reconhecimento de VEGF-A, em que resíduos ácidos de D3 contribuem de forma importante para o acoplamento do ligante (Wiesmann *et al.*, 1997). Já para ICAM-1 (Figura 14), observa-se uma região de cargas negativas contínuas nos domínios D4–D5, sobre o qual a toxina se apoia através de uma face catiônica, em consonância com interfaces descritas para a interação de ICAM-1 com proteínas parasitárias em domínios distais (Chen *et al.*, 2007).

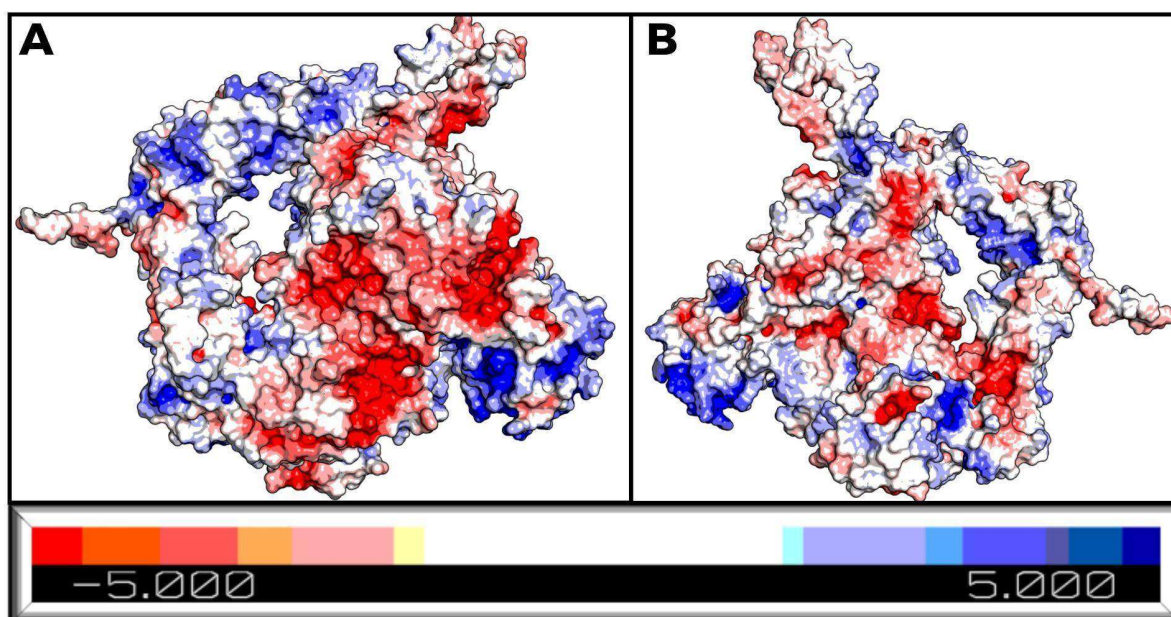


Figura 11. Superfícies eletrostáticas (APBS) do complexo BthTX-I + $\alpha 6\beta 1$. Vistas 0° (painel A) e 180° (painel B). Escala: -5 kT/e (vermelho) a +5 kT/e (azul).

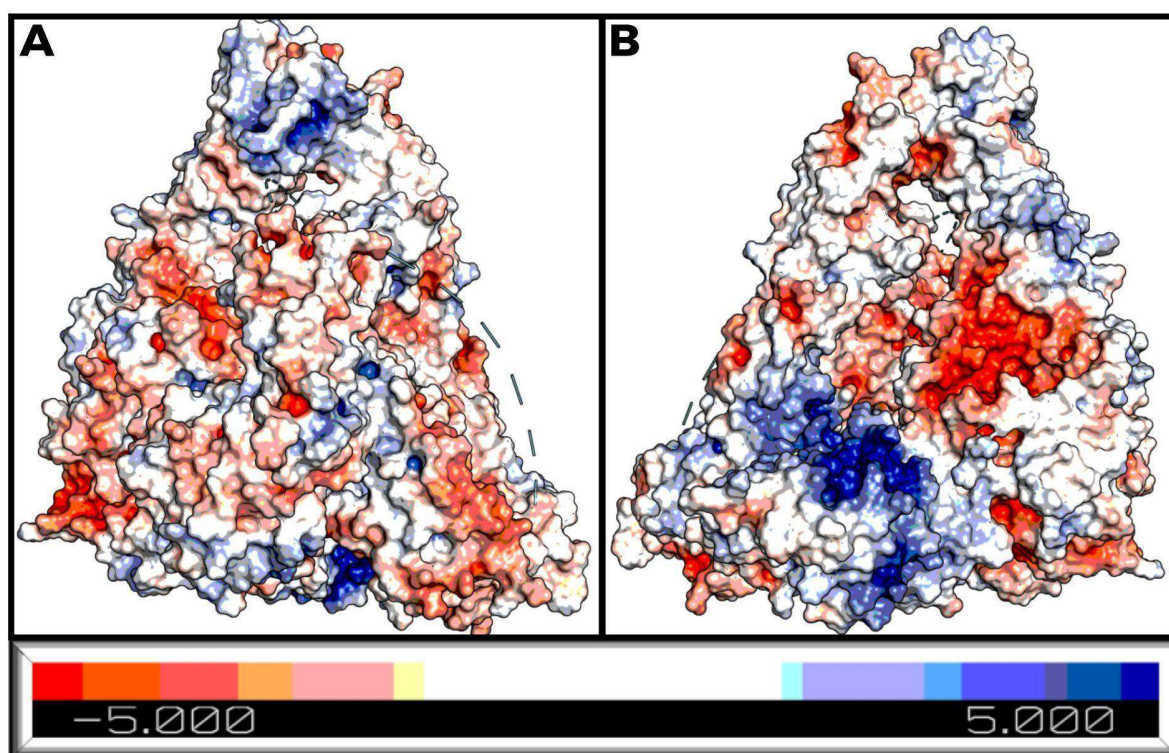


Figura 12. Superfícies eletrostáticas (APBS) do complexo BthTX-I + $\alpha v\beta 3$. Vistas 0° (painel A) e 180° (painel B). Escala: -5 kT/e (vermelho) a +5 kT/e (azul).

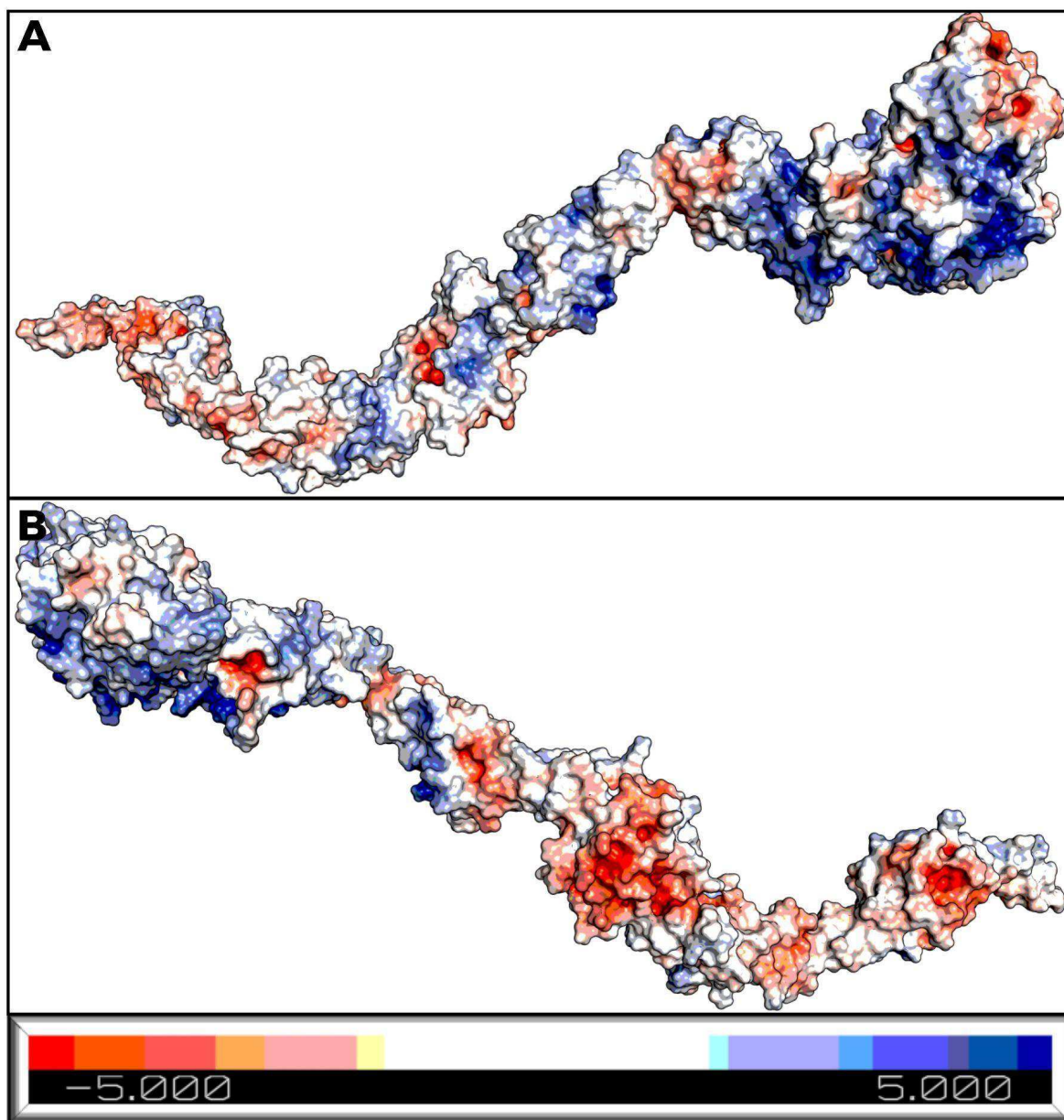


Figura 13. Superfícies eletrostáticas (APBS) do complexo BthTX-I + VEGFR2. Vistas 0° (painel A) e 180° (painel B). Escala: -5 kT/e (vermelho) a +5 kT/e (azul).

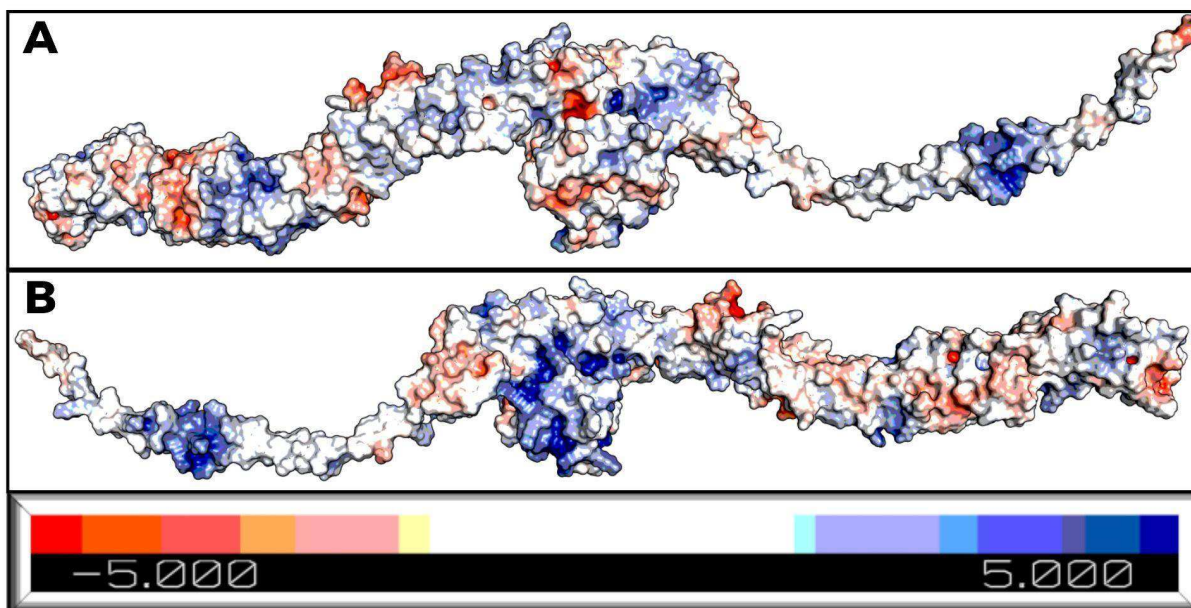


Figura 14. Superfícies eletrostáticas (APBS) do complexo BthTX-I + ICAM-1. Nas vistas 0° (painel A) e 180° (painel B). Escala: -5 kT/e (vermelho) a $+5 \text{ kT/e}$ (azul).

4.8. Energia livre de ligação (PBEE)

A energia livre de interação (ΔG_{int}) dos complexos proteína–proteína foi estimada com o PBEE, conforme descrito na Seção 3.7, empregando um esquema *end-state* do tipo MM/PBSA (molecular mechanics Poisson–Boltzmann surface area) para comparar, em solvente contínuo, o complexo e os respectivos componentes separados (Kollman *et al.*, 2000; Miller *et al.*, 2012; Genheden & Ryde, 2015). Nessa metodologia, valores mais negativos de ΔG_{int} indicam interação mais favorável sob as condições do modelo.

A Figura 15 apresenta os dados de afinidade energética prevista para a BthTX-I: $\alpha 6\beta 1$ ($\Delta G_{\text{int}} = -5724,54 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$) < $\alpha \nu \beta 3$ ($-4611,37 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$) < VEGFR2 ($-2846,62 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$) < ICAM-1 ($-1975,64 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$). Em termos comparativos, as duas integrinas exibem as energias mais favoráveis, com destaque para $\alpha 6\beta 1$, enquanto VEGFR2 e ICAM-1 apresentam interações previstas mais fracas. Esse ranqueamento é coerente com as superfícies eletrostáticas APBS (Seção 4.5), nas quais observamos complementaridade de cargas particularmente marcada nas interfaces com $\alpha 6\beta 1$ e $\alpha \nu \beta 3$, compatível com um

componente eletrostático relevante para o acoplamento inicial da toxina.

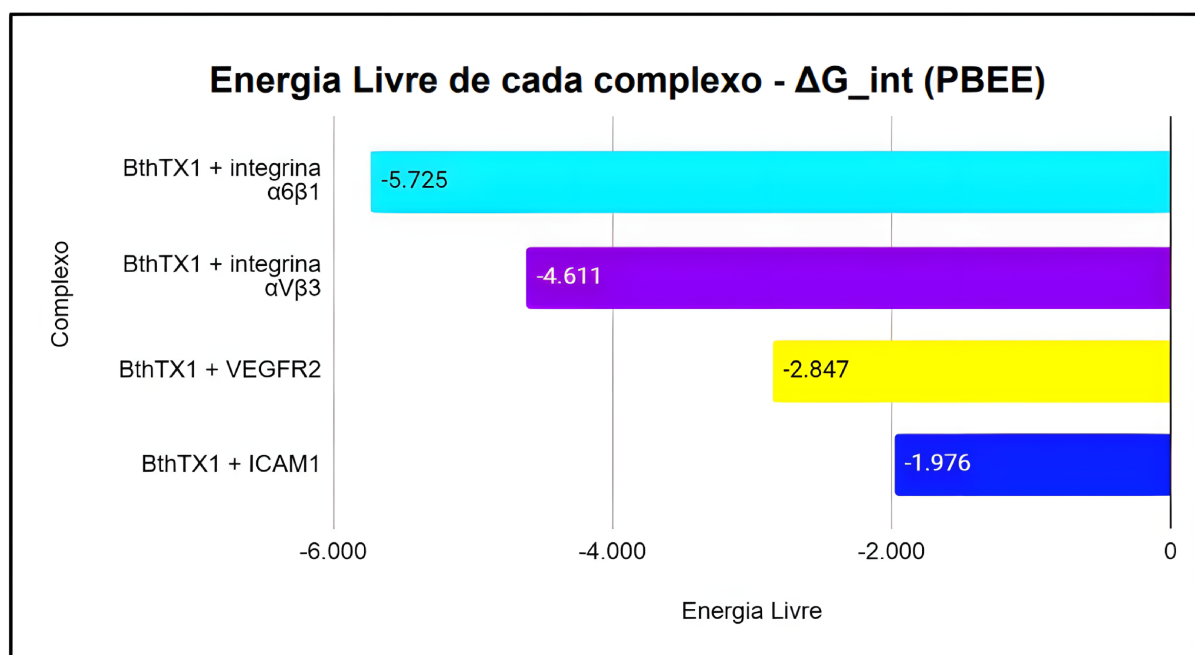


Figura 15. Energia livre de interação de cada complexo (PBEE). Energia livre de interação (ΔG_{int} , $\text{kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$) estimada por PBEE para BthTX-I em complexo com $\alpha6\beta1$, $\alpha V\beta3$, VEGFR2 e ICAM-1. Barras horizontais representam os valores calculados para o complexo representativo de cada alvo. Valores mais negativos indicam interações mais favoráveis sob o modelo PBEE.

5. DISCUSSÃO

5.1. Interação Molecular da BthTX-I com Proteínas de Membrana: Mapeamento dos Domínios Estruturais de Ligação

A BthTX-I é uma fosfolipase A_2 Lys49 isolada da peçonha de *Bothrops jararacussu*, cuja estrutura tridimensional revela um dímero estável com superfície majoritariamente básica, em especial na porção C-terminal de cada monômero, rica em resíduos Lys e Arg. Esses segmentos catiônicos, combinados a uma região anfipática que envolve a hélice $\alpha3$ e o *loop* C-terminal, são determinantes para interação com membranas e alvos proteicos na superfície celular, mesmo na ausência de atividade catalítica típica das PLA_2 Asp49 (da Silva Giotto et al., 1998; FERNANDES et al., 2010; LOMONTE; RANGEL, 2012). Essa arquitetura sugere que a BthTX-I pode atuar como um modelo de reconhecimento de superfícies carregadas

negativamente, o que é compatível com sua atividade citotóxica e com efeitos moduladores já descritos sobre células imunes e tumorais.

No presente trabalho, essa propriedade foi explorada na modelagem de complexos proteína-proteína entre a BthTX-I e quatro proteínas de membrana relevantes para a biologia de *T. gondii*: as integrinas $\alpha 6\beta 1$ (receptor de lamininas) e $\alpha v\beta 3$ (receptor RGD), o receptor tirosina-quinase VEGFR2 e a molécula de adesão ICAM-1. Essas proteínas compartilham o fato de organizarem domínios extracelulares essenciais para suas atividades, como β -propeller e domínio βI nas integrinas, domínios imunoglobulina em VEGFR2 e ICAM-1, que participam diretamente da adesão célula-matriz ou célula-célula e da sinalização subsequente (CAMPBELL; HUMPHRIES, 2011; ARIMORI et al., 2021; YANG et al., 2004; WIESMANN et al., 1997).

Os complexos foram previstos com o modelo de inteligência artificial Boltz-2 (Figuras 7-10), que fornece, entre outros parâmetros, o índice ipTM (interface predicted TM-score) (Figura 6) e métricas de confiança que refletem a consistência da interface proteína-proteína dentro do encaixe de modelos gerados. Valores de *Confidence score* $\geq 0,7$ – $0,8$ são interpretados como indicativos de interfaces bem definidas, com baixa variabilidade entre replicatas e orientações relativas estáveis entre os parceiros (PASSARO et al., 2025; CHAVES et al., 2025). Para complementar essa etapa, a energia livre de interação (ΔG_{int}) dos complexos foi estimada pelo modelo PBEE (Figura 15), que calcula contribuições eletrostáticas e de dessolvatação na interface, permitindo ordenar os modelos quanto à estabilidade prevista do complexo.

De forma geral, os complexos entre BthTX-I e integrinas apresentaram os maiores valores de *Confidence score* (Figura 6) e as energias de interação mais favoráveis entre todos os alvos analisados (Figura 15). A interação com a $\alpha 6\beta 1$ exibiu a ΔG_{int} mais negativa, seguida de $\alpha v\beta 3$, ao passo que VEGFR2 e ICAM-1 apresentaram valores menos favoráveis, embora ainda compatíveis com associação específica na região extracelular (ΔG_{int} em módulo menor que o observado para as integrinas). Esses resultados sugerem que, dentro do conjunto de proteínas de membrana estudadas, as integrinas representam alvos preferenciais da BthTX-I, o que é coerente com a natureza fortemente aniônica das superfícies de ligação a matriz extracelular das integrinas (ARIMORI et al., 2021; XIONG et al., 2002).

Nesse sentido, $\alpha 6\beta 1$ é um receptor prototípico de lamininas da membrana basal. Seu ectodomínio organiza-se em um headpiece formado pelo domínio β -propeller da subunidade $\alpha 6$ e pelo domínio βI (βA) da subunidade $\beta 1$, seguido por pernas proximais à membrana (CAMPBELL; HUMPHRIES, 2011; ARIMORI et al., 2021). No domínio βI localizam-se os sítios metálicos MIDAS, ADMIDAS e SyMBS, responsáveis pela coordenação do ligante e pela alosteria que converte a integrina entre estados de baixa e alta afinidade. Estudos de cristalografia e crio-EM com o complexo $\alpha 6\beta 1$ –laminina-511 (LM-511) demonstram um modo de ligação bipartido: a cauda C-terminal da cadeia $\gamma 1$ de laminina fornece o glutamato $\gamma 1$ -E1607 para coordenar o metal do MIDAS em $\beta 1$, enquanto seu carboxi-terminal (P1609) ancora em Asn189 de $\alpha 6$. Em paralelo, uma ampla superfície no domínio LG2 da cadeia $\alpha 5$ de laminina interage com o β -propeller de $\alpha 6$, em especial com a região X1 e com o loop II–III (ARIMORI et al., 2021; TAKIZAWA et al., 2017).

No complexo BthTX-I + $\alpha 6\beta 1$ gerado pelo Boltz-2 (Figura 7), os resíduos da subunidade $\alpha 6$ que participam da interface com a toxina concentram-se exatamente nessa porção superior do domínio β -propeller, abrangendo Thr83, Tyr112, Gln116, Lys114, Lys161, Arg195, Glu215, Glu219 e Asp223. Esses resíduos distribuem-se ao redor do loop II–III e da região X1, que na estrutura $\alpha 6\beta 1$ –LM-511 corresponde ao principal contato com o LG2 da laminina e inclui pares carregados críticos (D153, R155, R157, K161) para afinidade e especificidade (ARIMORI et al., 2021). Assim, a BthTX-I se apoia sobre a mesma face do β -propeller utilizada fisiologicamente para reconhecimento de LM-511, mas sem necessariamente possuir a mesma sequência de aminoácidos que a laminina.

Além disso, os mapas de potencial eletrostático calculados por APBS (Figura 11) mostram complementaridade clara entre a face básica/anfipática da BthTX-I e regiões ácidas/polares que circundam o sítio de captura de laminina no β -propeller de $\alpha 6$, reforçando a plausibilidade físico-química do encaixe observado nos modelos. Do ponto de vista topológico, a toxina se posiciona bloqueando a entrada do sítio de ligação laminina–headpiece, ocupando a região onde, no complexo nativo, a superfície inferior de LG2 se acomoda contra o β -propeller de $\alpha 6$ e a cauda $\gamma 1$ completa a ponte até o MIDAS de $\beta 1$. Esse mapeamento sugere que a BthTX-I compete por um sítio funcionalmente relevante da integrina e de alta densidade de carga, compatível com a forte energia de interação prevista para o complexo $\alpha 6\beta 1$ (Figura 15) em relação aos demais alvos analisados.

Já a $\alpha v\beta 3$, pertence à classe de integrinas reconhecedoras de motivos RGD (Arg-Gly-Asp) e medeia adesão a ligantes como vitronectina, fibronectina e osteopontina. Estruturalmente, seu ectodomínio também é organizado em um headpiece formado pelo β -propeller de αv e pelo domínio βI de $\beta 3$, onde o sítio MIDAS coordena o ácido aspártico do motivo RGD, em cooperação com ADMIDAS e SyMBS (XIONG et al., 2002; CAMPBELL; HUMPHRIES, 2011). O motivo RGD completo é lido por um arranjo em ponte: a arginina interage com resíduos ácidos no β -propeller de αv , enquanto o aspartato coordena o cátion do MIDAS em $\beta 3$, garantindo afinidade elevada e seletividade por ligantes contendo esse tripeptídeo.

No modelo BthTX-I + $\alpha v\beta 3$ (Figura 8), a interface de ligação envolve simultaneamente a face superior do β -propeller de αv e o domínio βI de $\beta 3$, isto é, exatamente a região estrutural que compõe o sítio de ligação RGD. A superfície de contato em αv inclui resíduos localizados entre os lâminas II–III e IV–V do β -propeller, que participam da formação da região que acomoda o resíduo Arg dos ligantes RGD, enquanto, em $\beta 3$, o contato se estende à vizinhança do sítio MIDAS. Ou seja, a interface de ligação da toxina com $\alpha v\beta 3$ é construída novamente por uma faixa de resíduos básicos e polares dispostos na região central e C-terminal da BthTX-I, com destaque para resíduos Lys/Arg que se projetam em direção à fenda formada entre β -propeller e domínio βI . Embora a BthTX-I não possua um motivo RGD linear, o arranjo tridimensional de suas cargas positivas permite que ela se encaixe na mesma região ocupada por ligantes naturais, explorando complementaridade eletrostática com resíduos ácidos de αv e coordenando, indiretamente, a vizinhança do MIDAS de $\beta 3$. Esse padrão é coerente com a natureza de muitos inibidores macromoleculares de integrinas RGD, que não dependem exclusivamente da sequência mínima RGD, mas utilizam farmacóforos tridimensionais mais extensos para explorar a interface α/β (XIONG et al., 2002; LÓPEZ et al., 2019).

Ademais, o receptor tirosina-quinase VEGFR2 apresenta sete domínios tipo imunoglobulina (Ig) na porção extracelular, dos quais os domínios D2 e D3 formam o sítio principal de ligação para VEGF-A e outros ligantes angiogênicos (WIESMANN et al., 1997; ROBERTS; PALACEK, 2017). Esses domínios Ig-like organizam uma interface alongada, em que o ligante se acomoda perpendicularmente ao eixo do receptor, utilizando uma combinação de contatos hidrofóbicos e polares.

Nos modelos de complexo BthTX-I + VEGFR2 (Figura 9), a interface da toxina se distribui preferencialmente ao longo de loops expostos nos domínios D2–D3, com participação destacada de resíduos localizados na face externa de D3 e na junção entre D2 e D3, região que contribui diretamente para o reconhecimento de VEGF nos modelos cristalográficos. A BthTX-I, por sua vez, utiliza a mesma região básica que participa das interações com integrinas, tendo resíduos Lys e Arg projetados contra superfícies carregadas negativamente e ricas em Asp/Glu no receptor (Figura 13).

Apesar da interface prevista para VEGFR2 ser menos extensa e apresentar energia de interação em módulo inferior à observada para as integrinas (Figura 15), o encaixe preserva duas características importantes, sendo elas a complementaridade eletrostática, com a face básica da BthTX-I voltada para uma região aniônica em D2–D3 e a sobreposição parcial com o sítio de ligação de VEGF, especialmente na borda de D3. Esses dados indicam que a BthTX-I pode reconhecer VEGFR2 em uma região funcionalmente relevante, associada ao reconhecimento de ligante, ainda que com menor energia livre de ligação do que nos complexos com integrinas (Figura 15).

Outrossim, a ICAM-1 é uma glicoproteína de membrana pertencente à superfamília das imunoglobulinas (IgSF), composta por cinco domínios Ig-like extracelulares (D1–D5) organizados em tandem. O domínio D1 contém o motivo de ligação à integrina LFA-1 e é crítico para adesão leucócito-endotélio, enquanto D4–D5 participam da oligomerização e da apresentação espacial do receptor na superfície celular (STAUNTON et al., 1990; YANG et al., 2004). Além disso, domínios distais de ICAM-1 podem mediar interações com proteínas parasitárias, como membros da família PfEMP1 em *Plasmodium falciparum*, o que reforça o papel desses segmentos na interface célula-patógeno (CHEN et al., 2007).

Nos modelos de complexo BthTX-I + ICAM-1 (Figura 10), a interface de ligação se concentra predominantemente nos domínios D4 e D5, com envolvimento de resíduos localizados na face externa desses domínios, em uma região que se sobrepõe, em parte, ao sítio descrito para a interação de ICAM-1 com PfEMP1 (CHEN et al., 2007). A BthTX-I interage com essa interface utilizando novamente sua superfície básica, estabelecendo contatos com resíduos ácidos e polares de D4–D5. A análise de potencial eletrostático revela um cenário semelhante ao observado para integrinas e VEGFR2 (Figura 14), ou seja, a toxina

se posiciona como um elemento catiônico sobre uma região aniônica do receptor, gerando uma interface estabilizada por múltiplas interações salinas e ligações de hidrogênio.

Estudos prévios com a MjTX-II, outra PLA₂ Lys49 de *Bothrops moojeni*, demonstraram experimentalmente a interação dessa toxina com ICAM-1 e VEGFR2, com mapeamento estrutural que indica alvos coincidentes nos domínios D1 e D4–D5 de ICAM-1 e nos domínios D2–D3 de VEGFR2 (TEIXEIRA et al., 2025). Os modelos de BthTX-I + alvos moleculares do presente trabalho, reproduzem esse padrão geral de reconhecimento, sugerindo que diferentes PLA₂ Lys49 podem compartilhar uma estratégia estrutural semelhante para reconhecer moléculas de adesão da família IgSF em domínios distais e funcionalmente relevantes.

Em conjunto, o mapeamento dos domínios de ligação da BthTX-I indica que a toxina explora preferencialmente superfícies aniônicas e funcionalmente críticas de integrinas ($\alpha 6 \beta 1$ e $\alpha v \beta 3$), VEGFR2 e ICAM-1. Nas integrinas, a interface se superpõe diretamente aos sítios de ligação de laminina ($\alpha 6 \beta 1$) e de ligantes RGD ($\alpha v \beta 3$), enquanto em VEGFR2 e ICAM-1 o acoplamento ocorre em domínios Ig-like envolvidos no reconhecimento de ligantes ou na organização supramolecular desses receptores. Essa relação estrutural estabelece a base para correlacionar os achados *in silico* com vias de sinalização específicas e com a inibição da infecção por *T. gondii* observada experimentalmente.

5.2. Implicações Funcionais para a Inibição da Infecção por *Toxoplasma gondii*: Proposta de Modelo Mecanístico

Os resultados *in silico* obtidos neste trabalho indicam que a BthTX-I reconhece de forma preferencial superfícies funcionalmente relevantes das integrinas $\alpha 6 \beta 1$ e $\alpha v \beta 3$ (Figuras 7 e 8), VEGFR2 e ICAM-1, explorando domínios diretamente envolvidos em adesão e sinalização. Quando analisados em junção com os ensaios *in vitro* realizados neste estudo, nos quais a BthTX-I reduziu de maneira significativa parâmetros de infecção por *T. gondii* nas condições testadas (Figura 3), sem induzir citotoxicidade acentuada às células hospedeiras (Figura 2), observa-se semelhança entre o perfil antiparasitário descrito para outras PLA₂ Lys49 e Asp49 da mesma família. Trabalhos anteriores demonstraram que a BnSP-7, uma Lys49 de *Bothrops pauloensis*, diminui adesão e proliferação de taquizoítas e reduz a taxa de células infectadas, com baixa toxicidade em concentrações intermediárias (BORGES et al., 2016). Mais recentemente, a MjTX-II, Lys49 de *Bothrops moojeni*, e a BthTX-II, Asp49 de *B.*

jararacussu, foram descritas como toxinas capazes de restringir a infecção por *T. gondii* ao modular ROS (reactive oxygen species), níveis de VEGF e receptores de membrana como VEGFR2 e ICAM-1 em modelos *in vitro* e *ex vivo* (TEIXEIRA et al., 2025; OLIVEIRA et al., 2025).

Esses dados evidenciam que PLA₂ de peçonha de serpente constituem uma classe de moléculas com potencial antiparasitário, cujo efeito não se limita à ação direta sobre o parasito, mas envolve também a modulação de receptores e vias de sinalização na célula hospedeira. Em PLA₂ Lys49, a ausência de atividade catalítica não impede um amplo espectro de ações celulares, que inclui desorganização de membranas, produção de ROS, alteração de microdomínios lipídicos e interferência com receptores de superfície (LOMONTE; RANGEL, 2012; LOMONTE, 2012; SOUSA et al., 2022). Considerando as similaridades estruturais entre BthTX-I e outras Lys49 e o padrão de interação previsto com integrinas, VEGFR2 e ICAM-1, é possível propor um modelo mecanístico em que a toxina atua predominantemente como moduladora de proteínas de membrana envolvidas na infecção e disseminação de *T. gondii*.

Nesse contexto, a invasão de células hospedeiras por *T. gondii* é um processo ativo e altamente coordenado, que depende da secreção sequencial de adesinas micronemais e proteínas de roptrias pelo parasito, mas que também é modulada por receptores da superfície celular e pelo estado do citoesqueleto de actina (PORTES et al., 2020; RAMÍREZ-FLORES; HUOT, 2025). Estudos com células dendríticas e monócitos demonstram que a infecção pelo parasito induz uma troca do padrão migratório dependente de integrinas $\beta 1$, no qual há desorganização de adesões focais, alteração da sinalização de $\beta 1$ integrinas e aumento da motilidade e capacidade de transmigração pelo endotélio (ROSS et al., 2018; ROSS et al., 2022). Esses processos envolvem a reorganização de complexos de adesão e a modulação de vias como FAK/Src, PI3K/Akt (phosphoinositide 3-kinase/protein kinase B - PKB) e MAPKs, fundamentais tanto para a estabilidade da célula na matriz quanto para a remodelação do citoesqueleto durante a entrada do parasito.

No presente trabalho, a BthTX-I foi prevista como ligante de alta afinidade relativa para o headpiece das integrinas $\alpha 6\beta 1$ e $\alpha v\beta 3$ (Figuras 7 e 8), ocupando superfícies que, nas estruturas cristalográficas, estão diretamente envolvidas no reconhecimento de laminina-511 ($\alpha 6\beta 1$) ou de ligantes RGD ($\alpha v\beta 3$) (ARIMORI et al., 2021; XIONG et al., 2002). Ao se

acoplar sobre essas interfaces, a toxina tende a competir com ligantes endógenos por sítios de ligação, restringir a mudança conformacional das integrinas entre estados de baixa e alta afinidade e perturbar o agrupamento lateral (clustering) desses receptores na membrana.

Nesse sentido, em células epiteliais e endoteliais, integrinas associadas à matriz basal, como $\alpha 6\beta 1$, e integrinas que reconhecem motivos RGD, como $\alpha v\beta 3$, atuam como acopladores mecânicos entre a matriz extracelular, as adesões focais e o citoesqueleto de actina, permitindo que a célula reorganize essas estruturas em resposta a forças externas. No contexto específico da infecção por *T. gondii*, Portes et al. (2020) utilizaram taquizoítos da cepa RH infectando macrófagos peritoneais murinos e fibroblastos HFF1 e mostraram que o pré-tratamento das células hospedeiras com inibidores de endocitose mediada por clatrina (clorpromazina, meio hipertônico de sacarose, Pitstop 2), de macropinocitose (amilorida, IPA-3) e da polimerização de actina (citocalasina D) reduz significativamente os índices de internalização do parasito, ao mesmo tempo em que aumenta a adesão de taquizoítos à superfície celular e promove o aparecimento de numerosas projeções de membrana e alterações marcantes na actina cortical. Esses achados indicam que a reorganização dinâmica do citoesqueleto e das estruturas de adesão da célula hospedeira é muito importante para a progressão da junção móvel e para a entrada eficiente de *T. gondii* (Portes et al., 2020), reforçando a ideia de que a modulação de integrinas e de seus complexos de adesão pode impactar diretamente a capacidade de invasão do parasito.

Assim, o primeiro componente do modelo proposto é que a BthTX-I compromete a capacidade adesiva da célula hospedeira, tornando mais difícil o rearranjo de actina e a formação de estruturas compatíveis com a entrada eficiente de taquizoítas. Em termos funcionais, isso se traduz na redução observada da taxa de células infectadas e da carga parasitária intracelular em presença da toxina (Figura 3), em paralelo ao que foi descrito para BnSP-7 e MjTX-II (BORGES et al., 2016; TEIXEIRA et al., 2025).

Além das integrinas, o presente estudo identificou a VEGFR2 como alvo potencial da BthTX-I, com interação prevista nos domínios Ig-like D2–D3, região que constitui o sítio principal de ligação do VEGF-A (Figura 9) (WIESMANN et al., 1997). Nesse sentido, foi demonstrado que a BnSP-7 exerce efeitos antiangiogênicos em modelos tumorais e modula a expressão de VEGF e de citocinas pró-inflamatórias, enquanto a MjTX-II foi descrita como capaz de restringir a infecção por *T. gondii* em células trofoblásticas e em modelos *ex vivo*

por aumentar ROS e reduzir níveis de VEGF, em paralelo à interação *in silico* com VEGFR2 (BORGES et al., 2016; TEIXEIRA et al., 2025; SANTOS et al., 2024). Ou seja, considerando que a BthTX-I se liga, nos modelos gerados, em uma região sobreposta ao sítio de reconhecimento de VEGF-A em VEGFR2 (Figura 9), é plausível propor que a toxina atue como um modulador negativo desse receptor, atenuando sua ativação ou desviando o padrão de sinalização intracelular. A inibição ou modulação de VEGFR2 tenderia a reduzir a sinalização pró-sobrevivência e pró-angiogênica mediada por PI3K/Akt e ERK1/2, podendo favorecer um ambiente celular mais oxidante (aumento de ROS) e menos permissivo à proliferação do parasito, em consonância com os mecanismos propostos para MjTX-II (TEIXEIRA et al., 2025). Em tecidos altamente vascularizados e críticos para a toxoplasmose congênita, como a placenta, a interferência simultânea em VEGFR2 e integrinas $\alpha\beta3/\alpha6\beta1$ pode impactar tanto a suscetibilidade da célula trofoblástica à infecção quanto a capacidade de disseminação de *T. gondii* no microambiente materno-fetal (OLIVEIRA et al., 2025; PORTES et al., 2020).

Já a ICAM-1 é um receptor das interações leucócito–endotélio, e sua expressão é regulada durante infecções e inflamação. Em modelos de toxoplasmose, *T. gondii* foi capaz de induzir aumento da expressão de ICAM-1 em células dendríticas infectadas, favorecendo uma troca do padrão migratório integrina-dependente que aumenta a capacidade dessas células de atravessarem barreiras endoteliais e disseminarem o parasito (ROSS et al., 2018; ROSS et al., 2022). De modo semelhante, ICAM-1 participa da adesão de células infectadas ao endotélio e pode contribuir para a travessia da barreira placentária, aspecto crítico na transmissão vertical.

No presente trabalho, a BthTX-I foi prevista como ligante principalmente dos domínios D4–D5 de ICAM-1 (Figura 10), região envolvida na oligomerização da molécula e na organização espacial do receptor na superfície celular, além de se sobrepor parcialmente ao sítio descrito para a interação com proteínas parasitárias em outros modelos, como PfEMP1 em *Plasmodium falciparum* (CHEN et al., 2007). A ocupação desses domínios por uma toxina catiônica como a BthTX-I pode comprometer a capacidade de ICAM-1 de formar arranjos supramoleculares estáveis e de interagir de forma ótima com integrinas $\beta2$ (como LFA-1) em leucócitos, reduzindo a eficiência da adesão e da transmigração de células infectadas.

Além disso, estudos com MjTX-II demonstraram que esta se liga a ICAM-1 em modelos *in silico* e, em conjunto com o efeito sobre VEGFR2, contribui para reduzir a infecção por *T. gondii* e modular mediadores inflamatórios (TEIXEIRA et al., 2025). A convergência entre os sítios previstos para MjTX-II e BthTX-I em ICAM-1 sugere que diferentes PLA₂ Lys49 podem compartilhar uma estratégia comum de limitar a disseminação parasitária interferindo na formação da ponte ICAM-1/integrina que sustenta o tráfego de células infectadas em tecidos e barreiras vasculares.

Ainda que o conjunto de resultados aponte, de forma consistente, para um mecanismo primário de modulação de adesão e sinalização (integrinas $\alpha 6\beta 1/\alpha v\beta 3$, VEGFR2 e organização distal de ICAM-1), é importante reconhecer que as Lys49-PLA₂ (como a BthTX-I) apresentam superfície básica/anfipática que interage com fosfolipídios aniônicos, podendo perturbar a membrana plasmática sem hidrólise catalítica, sobretudo por meio do segmento C-terminal catiônico (Lomonte & Rangel, 2012). Esse efeito pode redistribuir receptores (como integrinas) e amortecer sinalização de adesão de modo indireto. Ou seja, o fato de não observar-se citotoxicidade global pode indicar que, nas condições testadas, tais perturbações de membrana são subletais, porém suficientemente funcionais para afetar a interface parasito–hospedeiro.

Por fim, é importante destacar as limitações inerentes a abordagens *in silico* e ressaltar a necessidade de validação do modelo proposto utilizando abordagens experimentais diferentes, como *in vitro* ou *ex vivo*. Ainda assim, a relação entre determinantes atômicos conhecidos para cada receptor, complementaridade eletrostática, organização energética e fenótipo celular confere plausibilidade ao modelo proposto.

6. CONCLUSÃO

Este trabalho realizou análise *in silico* e *in vitro* para explorar a hipótese de que a BthTX-I (Lys49-PLA₂ de *Bothrops jararacussu*) interfere em eixos de adesão e sinalização do hospedeiro relevantes para a infecção por *T. gondii*. Utilizando uma abordagem composta por alinhamento e visualização de sequências, modelagem/controle de qualidade estrutural, docking (Boltz-2), cálculo de energia livre (PBEE) e mapeamento eletrostático (PyMOL/APBS), complementada por ensaio de viabilidade em BeWo e ensaio de proliferação de *T. gondii*. A partir disso, foi identificado que a BthTX-I apresenta interfaces de contato favoráveis com $\alpha 6\beta 1$, $\alpha v\beta 3$, VEGFR2 e ICAM-1, compatíveis com determinantes atômicos descritos na literatura para reconhecimento de laminina ($\alpha 6\beta 1$), motivos RGD ($\alpha v\beta 3$), sítio D2–D3 (VEGFR2) e domínios distais (D4–D5) de ICAM-1. Em paralelo, foi realizada com êxito a purificação e análise de homogeneidade de BthTX-I, observou-se manutenção da viabilidade de células BeWo e redução significativa da proliferação do parasito, sustentando a relevância funcional das interações modeladas.

Em síntese, a BthTX-I emerge como ferramenta molecular promissora e possível ponto de partida farmacológico para estratégias anti-toxoplasmose, devido a sua possibilidade de modular mecanismos de infecção explorados por *T. gondii*. A abordagem multi-alvo (análise de alvos celulares e parasitários) oferece um caminho racional para desenvolver intervenções que limitem a invasão, disseminação e sobrevivência do parasito, mantendo viabilidade do hospedeiro, e justifica a progressão do presente estudo para ensaios posteriores.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Anwar, K.N., Fazal, F., Malik, A.B., & Rahman, A. (2004). RhoA/ROCK pathway regulates thrombin-induced ICAM-1 expression in endothelium. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.*, 287(2):L476–L486.
- Argaw, A. T., et al. VEGF-mediated disruption of endothelial CLN-5 promotes blood–brain barrier breakdown. *PNAS* 106(6):1977–1982, 2009. doi:10.1073/pnas.0808698106. PubMed
- Arimori, T.; Miyazaki, N.; Mihara, E.; et al. (2021). Structural mechanism of laminin recognition by integrin. *Nat. Commun.* 12:4012. doi:10.1038/s41467-021-24184-8.
- Arni, R. K., & Ward, R. J. (1996). Phospholipase A₂—a structural review. *Toxicon*, 34(8), 827–841. [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(96\)00036-0](https://doi.org/10.1016/0041-0101(96)00036-0)
- Baba, M., Batanova, T., Kitoh, K. et al. Adhesion of *Toxoplasma gondii* tachyzoite-infected leukocytes to vascular endothelial cells via E-selectin, ICAM-1 and VCAM-1. *Sci. Rep.* 7, 15157 (2017). doi:10.1038/s41598-017-05956-z.
- BAĞCI, M.; BAĞCI, Ö. U. A comprehensive bibliometric analysis of research trends about congenital toxoplasmosis. *Türkiye Parazitoloji Dergisi*, v. 48, n. 3, p. 142-149, 2024. DOI: <https://doi.org/10.4274/tpd.galenos.2024.26056>
- Ballmer-Hofer, K., Andersson, A. E., Ratcliffe, L. E., & Berger, P. (2011). Neuropilin-1 promotes VEGFR-2 trafficking through Rab11 vesicles thereby specifying signal output. *Blood*, 118(3), 816–826. doi:10.1182/blood-2011-01-328773.
- Barczyk, M., Carracedo, S., & Gullberg, D. (2010). Integrins. *Cell and Tissue Research*, 339(1), 269–280. <https://doi.org/10.1007/s00441-009-0834-6>
- Barlow, K. A., Ó Conchúir, S., Thompson, S., Suresh, P., Lucas, J. E., Heinonen, M., & Kortemme, T. (2018). Flex ddG: Rosetta ensemble-based estimation of changes in protein–protein binding affinity upon mutation. *The Journal of Physical Chemistry B*, 122(21), 5389–5399. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcb.7b11367>
- Barragan, A., Brossier, F., & Sibley, L. D. Transepithelial migration of *Toxoplasma gondii* involves an interaction of intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) with the parasite adhesin MIC2. *Cell Microbiol.* 7(4):561–568 (2005). doi:10.1111/j.1462-5822.2005.00486.x.
- Belkin, A.M.; Stepp, M.A. (2000). Integrins as receptors for laminins. *Microsc. Res. Tech.* 51:280–301. doi:10.1002/1097-0029(20001101)51:3<280::AID-JEMT6>3.0.CO;2-O.
- Bella, J., Kolatkar, P.R., Marlor, C.W., Greve, J.M., & Rossmann, M.G. (1998). The structure of the two amino-terminal domains of human ICAM-1 suggests mechanisms for receptor binding. *PNAS*, 95(8), 4140–4145. (PDB 1IAM/1IC1).
- Benito-Jardón, M. et al. The fibronectin synergy site re-enforces cell adhesion and mediates a crosstalk between integrin classes. *eLife* (2017) 6:e22264. doi:10.7554/eLife.22264.

Bhowmick, T., et al. (2012). Effect of flow on endothelial endocytosis of ICAM-1-targeted nanocarriers (CAM-mediated endocytosis). *J. Control. Release*, 157(3):485–492.

Bitencourt, N. V., et al. (2023). Effects of dimerization, dendrimerization, and chirality in p-BthTX-I peptide analogs on the antibacterial activity and enzymatic inhibition of the SARS-CoV-2 PLpro protein. *Pharmaceutics*, 15(2), 436.
<https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15020436>

Black, M. W., & Boothroyd, J. C. (2000). Lytic cycle of *Toxoplasma gondii*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64(3), 607–623.
<https://doi.org/10.1128/MMBR.64.3.607-623.2000>

BOLLANI, L. et al. Congenital toxoplasmosis: the state of the art. *Frontiers in Pediatrics*, v. 10, 894573, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3389/fped.2022.894573>.

Borges, R. J., et al. (2023). Structural and functional studies of a snake venom phospholipase A2-like protein complexed to an inhibitor from *Tabernaemontana catharinensis*. *Biochimie*, 206, 105–115. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2022.10.011>

Borges, I. P. (2015). Anti-parasitic effect on *Toxoplasma gondii* induced by BnSp-7, Lys49-phospholipase A₂ homologue from *Bothrops pauloensis* venom. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Uberlândia. <https://doi.org/10.14393/ufu.di.2015.366>

Brozzo, M. S., Bjelic, S., Kisko, K., et al. (2012). Thermodynamic and structural description of allosterically regulated VEGFR-2 dimerization. *Blood*, 119(7), 1781–1788.
<https://doi.org/10.1182/blood-2011-11-390922>

Bui, T.M., Wiesolek, H.L., & Sumagin, R. (2020). ICAM-1: master regulator of barrier function and inflammation. *Front. Immunol.*, 11:519.

Burgdorf, K. S., Trabjerg, B. B., Pedersen, M. G., Nissen, J., Banasik, K., Pedersen, O. B., Sørensen, E., Nielsen, K. R., Erikstrup, C., & Ullum, H. (2022). Large-scale study of *Toxoplasma* and Cytomegalovirus shows an association between infection and serious psychiatric disorders. *Brain, Behavior, and Immunity*, 99, 424–433.
<https://doi.org/10.1016/j.bbi.2021.10.010>

Busk, M., Pytela, R., & Sheppard, D. (1992). Characterization of the integrin α v β 6 as a fibronectin-binding protein. *Journal of Biological Chemistry*, 267(9), 5790–5796.

Campbell, I.D.; Humphries, M.J. Integrin structure, activation, and interactions. *Cold Spring Harb Perspect Biol* (2011) 3(3):a004994. doi:10.1101/cshperspect.a004994.

Carman, C.V., & Springer, T.A. (2004). A transmigratory cup in leukocyte diapedesis. *J. Cell Biol.*, 167(2):377–388.

Carpén, O., Pallai, P., Staunton, D.E., & Springer, T.A. (1992). Association of ICAM-1 com citoesqueleto de actina/ α -actinina. *J. Cell Biol.*, 118(5), 1223–1234.

Cavalari, V. C., Cardoso Garcia, L. F., Massuda, R., & Albrecht, L. (2025). *Toxoplasma gondii*, endothelial cells and schizophrenia: is it just a barrier matter? *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, 15, 1468936. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2025.1468936>

COELHO, D. R. A. et al. Knowledge gaps and educational opportunities in congenital toxoplasmosis: a narrative review of Brazilian and global perspectives. *Tropical Medicine and Infectious Disease*, v. 9, n. 6, 137, 2024. DOI: <https://doi.org/10.3390/tropicalmed9060137>.

Chen, D. et al. (2021). Emerging roles of PLC γ 1 in endothelial biology. *Front. Cardiovasc. Med.* 8:760438. doi:10.3389/fcvm.2021.760438.

Chesnutt, B.C., et al. (2006). E-selectin induces LFA-1-dependent rolling on ICAM-1. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 291(2):H1147–H1155.

Chioato, L. et al. (2002). Distinct sites for myotoxic and membrane-damaging activities in the C-terminal region of a Lys49-phospholipase A2. *Biochemical Journal*, 366(3), 971–976. DOI: 10.1042/BJ20020092.

Cintra-Francischinelli, M., et al. (2009). Calcium imaging of muscle cells treated with snake myotoxins reveals toxin synergism and presence of acceptors. *Cell and Molecular Life Sciences*, 66(10), 1718–1728. <https://doi.org/10.1007/s00018-009-9053-2>

Clark, P.R., et al. (2007). Increased ICAM-1 expression reduces endothelial barrier function. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 293(5):H2843–H2852.

Collins, T., et al. (1995). NF- κ B and cytokine-inducible enhancers in CAMs. *FASEB J.*, 9(10):899–909.

Cook, J.H.; Ueno, N.; Lodoen, M.B. (2018). *Toxoplasma gondii* disrupts β 1 integrin signaling and focal adhesion formation during monocyte hypermotility. *J. Biol. Chem.* 293(9):3374–3385. doi:10.1074/jbc.M117.793281.

Correa-Netto, C. et al. (2010). Immunome and venom of *Bothrops jararacussu*: a proteomic approach to study the molecular immunology of snake toxins. *Toxicon*, 55(7), 1222–1235. DOI: 10.1016/j.toxicon.2009.12.018.

da Silva Aguiar, W. et al. (2020). Ontogenetic study of *Bothrops jararacussu* venom composition reveals distinct profiles. *Toxicon*, 186, 67–77. DOI: 10.1016/j.toxicon.2020.07.030.

da Silva Giotto, M.T. et al. (1998). Conformational changes in bothropstoxin I, a dimeric Lys49-phospholipase A2 homologue. *Proteins*, 30(4), 442–454. DOI: 10.1002/(SICI)1097-0134(19980301)30:4<442::AID-PROT11>3.0.CO;2-I.

da Silva Giotto, M. T., et al. (1998). Crystallographic and spectroscopic characterization of a molecular hinge: conformational changes in bothropstoxin I, a dimeric Lys49-phospholipase A₂ homologue. *Proteins*, 30(4), 442–454. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-0134\(19980301\)30:4<442::aid-prot11>3.0.co;2-i](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-0134(19980301)30:4<442::aid-prot11>3.0.co;2-i)

Dal Vechio, F.D.; et al. (2020). Rain forest shifts through time and riverine barriers shaped the diversification of South American terrestrial pit vipers (*Bothrops jararacussu* species group). *Journal of Biogeography*, 47(7), 1572–1586. DOI: 10.1111/jbi.13736.

Di Russo, J.; et al. (2017). Endothelial basement membrane laminin-511 is essential for shear stress response and vascular integrity. *EMBO J.* 36:1925–1943. doi:10.15252/embj.201694756.

Diamond, M.S., Staunton, D.E., de Fougères, A.R., et al. (1991). Binding of the integrin Mac-1 (CD11b/CD18) to the third immunoglobulin-like domain of ICAM-1. *Cell*, 65(6), 961–971.

Diniz-Sousa, R., Caldeira, C. A. D. S., Pereira, S. S., Da Silva, S. L., Fernandes, P. A., Teixeira, L. M. C., Zuliani, J. P., & Soares, A. M. (2023). Therapeutic applications of snake venoms: An invaluable potential of new drug candidates. *International Journal of Biological Macromolecules*, 238, 124357. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.124357>

Dominguez, C., Boelens, R., & Bonvin, A. M. (2003). HADDOCK: a protein-protein docking approach based on biochemical or biophysical information. *Journal of the American Chemical Society*, 125(7), 1731–1737. <https://doi.org/10.1021/ja026939x>

Domogatskaya, A. et al. (2008). Laminin-511 enables mouse embryonic stem cell self-renewal in vitro. *Stem Cells* 26:2800–2809. doi:10.1634/stemcells.2007-0389.

Dos Santos, J. I., et al. (2011). Structural and functional studies of a bothropic myotoxin complexed to rosmarinic acid: new insights into Lys49-PLA₂ inhibition. *PLoS ONE*, 6(12), e28521. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0028521>

Dunn, D.; Wallon, M.; Peyron, F.; Petersen, E.; Peckham, C.; Gilbert, R. Mother-to-child transmission of toxoplasmosis: risk estimates for clinical counselling. *Lancet* 1999, 353(9167), 1829–1833. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(98\)07554-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(98)07554-3)

Fernandes, C. A., et al. (2015). Structural basis for the inhibition of a phospholipase A₂-like toxin by caffeic and aristolochic acids. *PLoS ONE*, 10(7), e0133370. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0133370>

Freitas-de-Sousa, L.A. et al. (2020). Size Matters: An evaluation of the molecular basis of ontogenetic modifications in the composition of Bothrops jararacussu snake venom. *Toxins*, 12(12), 791. DOI: 10.3390/toxins12120791.

Fuks, J. M., Arrighi, R. B., Weidner, J. M., Kumar Mendu, S., Jin, Z., Wallin, R. P., ... & Barragan, A. (2012). GABAergic signaling is linked to a hypermigratory phenotype in dendritic cells infected by *Toxoplasma gondii*. *PLoS Pathogens*, 8(12), e1003051. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003051>

Furtado, G.C.; Cao, Y.; Joiner, K.A. (1992). Laminin on *Toxoplasma gondii* mediates parasite binding to the $\beta 1$ integrin receptor $\alpha 6\beta 1$ on fibroblasts and CHO cells. *Infect. Immun.* 60:4925–4931. doi:10.1128/iai.60.11.4925-4931.1992.

Furtado, J. M., Bharadwaj, A. S., Ashander, L. M., et al. Tachyzoites cross retinal endothelium; this migration relies in part on retinal endothelial ICAM-1. *Immunol. Cell Biol.* 90(10):912–915 (2012). doi:10.1038/icb.2012.21.

Gavard, J., & Gutkind, J. S. (2006). VEGF controls endothelial-cell permeability by promoting the β -arrestin-dependent endocytosis of VE-cadherin. *Nature Cell Biology*, 8(11), 1223–1234. doi:10.1038/ncb1486.

Gomes, A. A. S., Cardoso, F. F., Souza, M. F., et al. (2020). The allosteric activation mechanism of a phospholipase A₂-like toxin from *Bothrops jararacussu* venom: a dynamic description. *Scientific Reports*, 10, 16252. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-73134-9>

Gupta, S., Kapoor, P., Chaudhary, K., Gautam, A., Kumar, R., Raghava, G. P. S. (2013). In silico approach for predicting toxicity of peptides and proteins. *PLoS ONE*, 8(9), e73957. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0073957>

Gutiérrez, J. M., Casewell, N. R., & Laustsen, A. H. (2025). Progress and Challenges in the Field of Snakebite Envenoming Therapeutics. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 65(1), 465–485. <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-022024-033544>

Gutiérrez, J. M., & Lomonte, B. (1995). Phospholipase A₂ myotoxins from *Bothrops* snake venoms. *Toxicon*, 33(11), 1405–1424. [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(95\)00085-z](https://doi.org/10.1016/0041-0101(95)00085-z)

Halonen, S. K.; Weiss, L. M. Toxoplasmosis. In *Handbook of Clinical Neurology*; 2013; Vol. 114, pp. 125–145. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-53490-3.00008-X>

Harper, J. M., Hoff, E. F., & Carruthers, V. B. (2004). Multimerization of the *Toxoplasma gondii* MIC2 integrin-like A-domain is required for binding to heparin and human cells. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 134(2), 201–212. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2003.12.001>

Heemskerk, N., et al. (2014). Rho-GTPase signaling in leukocyte extravasation (ICAM-1 clustering→RhoA). *Cell Adhes. Migr.*, 8(6):294–305.

Heiska, L., Kantor, C., Parr, T., et al. (1998). Association of ezrin with ICAM-1 cytoplasmic domain. *J. Biol. Chem.*, 273(34), 21893–21900.

Hynes, R. O. (2002). Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell*, 110(6), 673–687. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00971-6](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00971-6)

Inoue, O. et al. (2005). Laminin stimulates spreading of platelets through integrin $\alpha 6\beta 1$. *J. Biol. Chem.* 280:3167–3175. doi:10.1074/jbc.M411112200.

Jiménez, D., Roda-Navarro, P., & Casasnovas, J.M. (2005). Contribution of N-linked glycans to the conformation and function of ICAMs. *J. Biol. Chem.*, 280(30), 27705–27712.

Kim, E., Hwang, D. H., Mohan Prakash, R. L., Asirvatham, R. D., Lee, H., Heo, Y., Munawir, A., Seyedian, R., & Kang, C. (2025). Animal Venom in Modern Medicine: A Review of Therapeutic Applications. *Toxins*, 17(8), 371. <https://doi.org/10.3390/toxins17080371>

Kini, R. M., & Evans, H. J. (1987). Structure-function relationships of phospholipases. *Journal of Biological Chemistry*, 262(30), 14402–14407. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)47808-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)47808-8)

- Koch, S.; Claesson-Welsh, L. (2012). Signal transduction by VEGF receptors. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2(7):a006502. doi:10.1101/cshperspect.a006502.
- Kollman, P. A., Massova, I., Reyes, C., Kuhn, B., Huo, S., Chong, L., ... & Cheatham, T. E. (2000). Calculating structures and free energies of complex molecules: combining molecular mechanics and continuum models. *Accounts of Chemical Research*, 33(12), 889–897. <https://doi.org/10.1021/ar000033j>
- Krebsbach, P.H.; Villa-Diaz, L.G. (2017). The role of integrin $\alpha 6$ (CD49f) in stem cells. *Stem Cells* 35:8–16. doi:10.1002/stem.2508.
- Lamallice, L., Houle, F., Jourdan, G., & Huot, J. (2004). Phosphorylation of tyrosine 1214 on VEGFR2 is required for VEGF-induced activation of Cdc42 upstream of SAPK2/p38. *Oncogene*, 23(2), 434–445. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1207034>
- Lamarque, M., Besteiro, S., Papoin, J., et al. (2011). The RON2-AMA1 interaction is a critical step in moving junction-dependent invasion by apicomplexan parasites. *PLoS Pathog.*, 7(2), e1001276. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1001276>
- Lamarque, M., Roques, M., Kong-Hap, M., et al. (2014). Plasticity and redundancy among AMA–RON pairs ensure host cell entry of *Toxoplasma* parasites. *Nat. Commun.*, 5, 4098. <https://doi.org/10.1038/ncomms5098>
- Lambert, H., Hitziger, N., Dellacasa, I., Svensson, M., & Barragan, A. Induction of dendritic cell migration upon *T. gondii* infection drives hypermotility and transmigration. *J. Immunol.* 177(10): 6954–6962 (2006).
- Lammerding, J. et al. (2003). Tetraspanin CD151 regulates $\alpha 6 \beta 1$ integrin adhesion strengthening. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100:7616–7621. doi:10.1073/pnas.1337546100.
- Lampugnani, M. G., Orsenigo, F., Gagliani, M. C., Tacchetti, C., & Dejana, E. (2006). Vascular endothelial cadherin controls VEGFR-2 internalization and signaling from intracellular compartments. *Journal of Cell Biology*, 174(4), 593–604. doi:10.1083/jcb.200602080.
- Lau, E., et al. (2019). High-mannose ICAM-1 e implicações funcionais. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 317(4):C781–C797; e PLOS ONE 2020 sobre N-glicoformas de ICAM-1.
- Leppänen, V.M. et al. (2013). Structural and mechanistic insights into VEGF receptor–ligand binding (comparative principles across VEGFRs). *PNAS* 110(32):12960–12965. doi:10.1073/pnas.1301415110.
- Liu, L. et al. (2007). Tetraspanin CD151 promotes cell migration by regulating integrin trafficking. *J. Biol. Chem.* 282:316–326. doi:10.1074/jbc.M701165200.
- Lomonte, B., & Rangel, J. (2012). Snake venom Lys49 myotoxins: From phospholipases A_2 to non-enzymatic membrane disruptors. *Toxicon*, 60(4), 520–530. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2012.02.007>

Lopez Corcino, Y. et al. (2019). Toxoplasma induces prolonged host EGFR signaling enabling the parasite to avoid initial autophagic targeting. *Cell Microbiol.* 21:e13084. doi:10.1111/cmi.13084.

Mao, Y.; Schwarzbauer, J.E. Fibronectin fibrillogenesis, a cell-mediated matrix assembly process. *Matrix Biol* (2005) 24(6):389–399. doi:10.1016/j.matbio.2005.06.008.

Matsumoto, T., et al. (2005). VEGF receptor-2 Y951 signaling and a role for the adapter molecule TSAd in tumor angiogenesis. *The EMBO Journal*, 24(13), 2342–2353. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600709>

MCLEOD, R.; LYKINS, J.; NOBLE, A. G. *et al.* Management of congenital toxoplasmosis. *Current Pediatrics Reports*, v. 2, n. 3, p. 166-194, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1007/s40124-014-0055-7>.

McTigue, M., et al. (2012). Molecular conformations, interactions, and properties associated with drug efficiency and clinical performance among VEGFR tyrosine-kinase inhibitors. *PNAS*, 109(45), 18281–18289. <https://doi.org/10.1073/pnas.1207759109> (PDB 4ASD, 4AG8 demonstram estados da quinase com inibidores.)

Mitra, S.K.; Hanson, D.A.; Schlaepfer, D.D. Focal adhesion kinase: in command and control of cell motility. *Nat Rev Mol Cell Biol* (2005) 6(1):56–68. doi:10.1038/nrm1549.

Modi, S.J.; Kulkarni, V.M. (2019). VEGFR-2: structure, inhibitors and selectivity (gatekeeper Val916, hinge Cys919, DFG-in/out). *Comput. Struct. Biotechnol. J.* 17:318–331. doi:10.1016/j.csbj.2019.02.004.

Montoya, J. G.; Liesenfeld, O. Toxoplasmosis. *The Lancet* 2004, 363(9425), 1965–1976. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(04\)16412-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(04)16412-X)

Morsing, S.K.H., et al. (2021). ADAM10-mediated cleavage of ICAM-1 supports neutrophil transendothelial migration. *Cells*, 10(2):232.

Muniz-Feliciano, L. et al. (2013). Toxoplasma gondii-induced activation of EGFR prevents autophagy protein-mediated killing of the parasite. *PLoS Pathog.* 9:e1003809. doi:10.1371/journal.ppat.1003809.

Muscat, E.; et al. (2021). Natural history of the Jararacuçu, Bothrops jararacussu, in agro-mosaic landscapes in southeastern Brazil. *Herpetological Conservation and Biology*, 16(1), 202–217.

Nakashima, Y. et al. (2022). Laminin-511 activates human iPSC survival via $\alpha 6 \beta 1$ –Fyn–RhoA–ROCK signaling. *Stem Cells Dev.* 31:1228–1239. doi:10.1089/scd.2022.0010.

Nishiuchi, R., Murayama, O., Fujiwara, H., Gu, J., Kawakami, T., Aimoto, S., Wada, Y., & Sekiguchi, K. (2003). Characterization of the ligand-binding specificities of integrin $\alpha 3 \beta 1$ and $\alpha 6 \beta 1$ using a panel of purified laminin isoforms containing distinct α chains. *Journal of Biochemistry*, 134(4), 497–504. <https://doi.org/10.1093/jb/mvg185>

Nunes, D. C., et al. (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(7), 844–854. <https://doi.org/10.1017/S0031182013000012>

Ólafsson, E.B.; Ross, E.C.; Varas-Godoy, M.; Barragan, A. (2019). TIMP-1 promotes hypermigration of *Toxoplasma*-infected primary dendritic cells via CD63–ITGB1–FAK signaling. *J. Cell Sci.* 132:jcs225193. doi:10.1242/jcs.225193.

Ólafsson, E.B.; Ross, E.C.; Varas-Godoy, M.; Barragan, A. (2019). TIMP-1 promotes hypermigration of *Toxoplasma*-infected primary dendritic cells via CD63–ITGB1–FAK signaling. *J. Cell Sci.* 132:jcs225193. doi:10.1242/jcs.225193.

Olivera, G.C.; Ross, E.C.; Peuckert, C.; Barragan, A. (2021). Blood–brain barrier-restricted translocation of *Toxoplasma gondii* from cortical capillaries. *eLife* 10:e69182. doi:10.7554/eLife.69182.

Olivera, G.C.; Ross, E.C.; Peuckert, C.; Barragan, A. (2021). Blood–brain barrier-restricted translocation of *Toxoplasma gondii* from cortical capillaries. *eLife* 10:e69182. doi:10.7554/eLife.69182.

Olivera, G. C., Ross, E. C., Peuckert, C., et al. Blood–brain barrier-restricted translocation of *T. gondii* from cortical capillaries. *eLife* 10:e69182 (2021). doi:10.7554/eLife.69182.

Parsons, J.T. Focal adhesion kinase: the first ten years. *J Cell Sci* (2003) 116(8):1409–1416. doi:10.1242/jcs.00373.

PESSANHA, T. M.; CARVALHO, M.; PONE, M. V. S.; GOMES JÚNIOR, S. C. Abordagem diagnóstica e terapêutica da toxoplasmose em gestantes e as repercussões no recém-nascido. *Revista Paulista de Pediatria*, São Paulo, v. 29, n. 3, p. 341-347, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0103-05822011000300006>.

Pettersen, E. F., Goddard, T. D., Huang, C. C., Couch, G. S., Greenblatt, D. M., Meng, E. C., & Ferrin, T. E. (2021). UCSF ChimeraX: Structure visualization for researchers, educators, and developers. *Protein Science*, 30(1), 70–82. <https://doi.org/10.1002/pro.3943>

Portes, J., Barrias, E., Travassos, R., Attias, M., & de Souza, W. (2020). *Toxoplasma gondii* mechanisms of entry into host cells. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10, 294. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00294>

Portillo, J.A.C.; Muniz-Feliciano, L.; Lopez Corcino, Y.; et al. (2017). *Toxoplasma gondii* induces FAK–Src–STAT3 signaling during infection of host cells that prevents parasite targeting by autophagy. *PLoS Pathog.* 13:e1006671. doi:10.1371/journal.ppat.1006671.

Portillo, J. A. C., et al. *Toxoplasma gondii* induces FAK–Src–STAT3 signaling during invasion to prevent autophagic killing. *PLoS Pathog.* 13(10):e1006671, 2017.

Proebstl, D., et al. (2012). Pericytes support neutrophil subendothelial crawling (Mac-1/ICAM-1-dependente). *J. Exp. Med.*, 209(6):1219–1234.

Qiu, Z., et al. (2022). Roles of ICAM-1 in cancer (seção sobre glicosilação e função). *Front. Immunol.*, 13:997360.

Quan, J. H., Ismail, H. A. H. A., Cha, G. H., Jo, Y. J., Gao, F. F., Choi, I. W., Chu, J. Q., Yuk, J. M., & Lee, Y. H. (2020). VEGF production is regulated by the AKT/ERK1/2 signaling pathway and controls the proliferation of *Toxoplasma gondii* in ARPE-19 cells. *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, 10, 184. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00184>

Ramos, T.N., Bullard, D.C., & Barnum, S.R. (2014). ICAM-1: isoforms and phenotypes (sinapse imunológica). *J. Immunol. Res.*, 2014:1–12.

RCSB PDB. 7CEC – Structure of $\alpha 6 \beta 1$ integrin in complex with laminin-511. (2021). RCSB PDB

RCSB PDB: 7BG7 – HRV14 em complexo com ICAM-1 (2021).

Rodriguez, M. E., et al. ICAM-1/CD18-mediated sequestration of parasitized phagocytes in cortical capillaries (CNS invasion model). *Nat. Commun.* (2025). doi:10.1038/s41467-025-58655-z.

Roman-Ramos, H., & Ho, P. L. (2024). Current Technologies in Snake Venom Analysis and Applications. *Toxins*, 16(11), 458. <https://doi.org/10.3390/toxins16110458>

Ross, E.C.; Ten Hoeve, A.L.; Barragan, A. (2021). Integrin-dependent migratory switches regulate the translocation of *Toxoplasma*-infected dendritic cells across brain endothelial monolayers. *Cell. Mol. Life Sci.* 78:5197–5212. doi:10.1007/s00018-021-03858-y.

Ross, E.C.; Olivera, G.C.; Barragan, A. (2019). Dysregulation of focal adhesion kinase upon *Toxoplasma gondii* infection facilitates parasite translocation across polarised primary brain endothelial cell monolayers. *Cell. Microbiol.* 21:e13048. doi:10.1111/cmi.13048.

Ross, E. C., ten Hoeve, A. L., Saeij, J. P. J., & Barragan, A. *Toxoplasma* effector-induced ICAM-1 expression by infected dendritic cells potentiates transmigration across polarised endothelium. *Front. Immunol.* 13:950914 (2022). doi:10.3389/fimmu.2022.950914.

Ruch, C., Skiniotis, G., Steinmetz, M. O., Walz, T., & Ballmer-Hofer, K. (2007). Structure of a VEGF–VEGF receptor complex determined by electron microscopy. *Nature Structural & Molecular Biology*, 14(3), 249–250. <https://doi.org/10.1038/nsmb1202>

Saadatnia, G.; Golkar, M. A review on human toxoplasmosis. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases* 2012, 44(11), 805–814. DOI: <https://doi.org/10.3109/00365548.2012.693197>

Salvador, G. H. M., et al. (2023). Structural basis of the myotoxic inhibition of the *Bothrops pirajai* PrTX-I by the synthetic varespladib. *Biochimie*, 207, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2022.11.006>

Salvador, G. H., et al. (2013). Structural and functional studies with myotoxin II from *Bothrops moojeni* reveal remarkable similarities and differences compared to other catalytically inactive phospholipases A₂-like. *Toxicon*, 72, 52–63. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2013.06.013>

Santos-Filho, N. A., et al. (2017). Antibacterial activity of the non-cytotoxic peptide (p-BthTX-I)₂ and its serum degradation product against multidrug-resistant bacteria. *Molecules*, 22(11), 1898. <https://doi.org/10.3390/molecules22111898>

Sarabipour, S. et al. (2016). VEGFR-2 conformational switch in response to ligand binding. *eLife* 5:e13876. doi:10.7554/eLife.13876.

Sarabipour, S., Hristova, K., et al. (2016). VEGFR-2 conformational switch in response to ligand binding. *eLife*, 5:e13876. <https://doi.org/10.7554/eLife.13876>

Saso, A. *et al.* Fifteen-minute consultation: management of the infant born to a mother with toxoplasmosis in pregnancy. *Archives of Disease in Childhood – Education and Practice Edition*, v. 105, n. 5, p. 262-269, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1136/archdischild-2018-316603>.

Schaff, M. et al. (2013). Integrin $\alpha 6 \beta 1$ is the main receptor for vascular laminins and plays a role in platelet adhesion, activation, and arterial thrombosis. *Circulation* 128:541–552. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.112.000799.

Schnoor, M., Alcaide, P., Voisin, M.B., & van Buul, J.D. (2015). Crossing the vascular wall: ICAM-1/VCAM-1 as mediadores centrais. *Front. Immunol.*, 6:22.

Schuindt, S.H.S.; Oliveira, B.C.L.; Pimentel, P.M.O.; et al. (2012). Secretion of multi-protein migratory complex induced by *Toxoplasma gondii* infection in macrophages involves the uPA/uPAR activation system. *Vet. Parasitol.* 186:207–215. doi:10.1016/j.vetpar.2011.11.035.

Seipel, D.; Oliveira, B.C.L.; Resende, T.L.; et al. (2010). *Toxoplasma gondii* infection positively modulates the macrophages migratory molecular complex by increasing matrix metalloproteinases, CD44 and $\alpha v \beta 3$ integrin. *Vet. Parasitol.* 169:312–319. doi:10.1016/j.vetpar.2009.12.042.

Shimaoka, M., Xiao, T., Liu, J.-H., et al. (2003). Structures of the αL I domain and its complex with ICAM-1 reveal a shape-shifting pathway for integrin regulation. *Cell*, 112(1), 99–111. (PDB 1MQ8).

Shrikant, P., & Benveniste, E.N. (1994). Cytokine-induced ICAM-1 in astrócitos. *J. Immunol.*, 152(3):1411–1418.

Silva, K.M.P.; et al. (2020). Reproduction in the pitviper *Bothrops jararacussu*. *Zoology*, 141, 125816. DOI: 10.1016/j.zool.2020.125816.

Simons, M., Gordon, E., & Claesson-Welsh, L. (2012). An inside view: VEGF receptor trafficking and signaling. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 32(10), 2119–2127. doi:10.1161/ATVBAHA.112.300173.

Soldi, R., Mitola, S., Strasly, M., et al. (1999). Role of $\alpha v \beta 3$ integrin in the activation of vascular endothelial growth factor receptor-2. *EMBO Journal*, 18(4), 882–892. doi:10.1093/emboj/18.4.882.

Somanath, P. R., Malinin, N. L., & Byzova, T. V. (2009). Cooperation between integrin $\alpha\text{v}\beta 3$ and VEGFR2 in angiogenesis. *Angiogenesis*, 12(2), 177–185. doi:10.1007/s10456-009-9141-9.

Stipp, C.S.; Kolesnikova, T.V.; Hemler, M.E. (2010). Laminin-binding integrins and their tetraspanin partners as potential antimetastatic targets. *Expert Rev. Mol. Med.* 12:e3. doi:10.1017/S1462399409001341.

Sun, Z., Li, X., Massena, S., et al. (2012). VEGFR2 induces c-Src signaling and vascular permeability in vivo via the adaptor protein TAd. *Journal of Experimental Medicine*, 209(7), 1363–1377. doi:10.1084/jem.20111343.

Takizawa, M.; Arimori, T.; Taniguchi, Y.; et al. (2017). Mechanistic basis for the recognition of laminin-511 by $\alpha 6\beta 1$ integrin. *Sci. Adv.* 3:e1701497. doi:10.1126/sciadv.1701497.

Teixeira, S. C., Fernandes, T. A. M., Souza, G., et al. (2025). MjTX-II, a Lys49-PLA₂ from Bothrops moojeni snake venom, restricts Toxoplasma gondii infection via ROS and VEGF regulation. *Chemico-Biological Interactions*, 409, 111417. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2025.111417>

Teixeira, S. C., et al. MjTX-II, a Lys49-PLA₂ from Bothrops moojeni snake venom, restricts Toxoplasma gondii infection via ROS and VEGF regulation. *Chem. Biol. Interact.* 409:111417, 2025.

Tenter, A. M., Heckeroth, A. R., & Weiss, L. M. (2000). Toxoplasma gondii: from animals to humans. *Int. J. Parasitol.*, 30(12–13), 1217–1258. [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(00\)00124-7](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(00)00124-7)

Teran, M., & Nugent, M. A. (2015). Synergistic binding of VEGF-A and neuropilin-1 to heparan sulfate. *Journal of Biological Chemistry*, 290(23), 14843–14858. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.642439> ScienceDirect

Ullah, A., Souza, T. A. C. B., Betzel, C., Murakami, M. T., & Arni, R. K. (2012). Crystallographic portrayal of different conformational states of a Lys49 phospholipase A₂ homologue: Insights into structural determinants for myotoxicity and dimeric conFiguration. *International Journal of Biological Macromolecules*, 51(3), 209–214. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2012.05.006>

UniProtKB – P05362 (ICAM1_HUMAN): anotação de domínios, glicosila  o e ligações (acessado para suporte estrutural).

Vangone, A., & Bonvin, A. M. (2015). Contacts-based prediction of binding affinity in protein-protein complexes. *eLife*, 4, e07454. <https://doi.org/10.7554/eLife.07454>

Vázquez Torres, S., Benard Valle, M., Mackessy, S. P., et al. (2025). De novo designed proteins neutralize lethal snake venom toxins. *Nature*, 639, 225–231. <https://doi.org/10.1038/s41586-024-08393-x>

Wang, Y., Fang, R., Yuan, Y., et al. (2014). Identification of host proteins interacting with the integrin-like A domain of T. gondii micronemal protein MIC2 by yeast-two-hybrid screening. *Parasites & Vectors*, 7, 543. <https://doi.org/10.1186/s13071-014-0543-1>

- Wang, Y., Fang, R., Yuan, Y., Hu, M., Zhou, Y., & Zhao, J. (2014). Identification of host proteins interacting with the integrin-like A domain of *Toxoplasma gondii* micronemal protein MIC2 by yeast-two-hybrid screening. *Parasites & Vectors*, 7, 543. <https://doi.org/10.1186/s13071-014-0543-1>
- Wang, X., Bove, A. M., Simone, G., & Ma, B. (2020). Molecular bases of VEGFR-2-mediated physiological function and pathological role. *Front. Cell. Dev. Biol.*, 8, 599281. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.599281>
- Wang, X. et al. (2020). Molecular bases of VEGFR-2-mediated physiological function and pathological role. *Front. Cell Dev. Biol.* 8:599281. doi:10.3389/fcell.2020.599281.
- Wang, X., Bove, A. M., Simone, G., & Ma, B. (2020). Molecular bases of VEGFR-2-mediated physiological function and pathological role. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 8, 599281. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.599281>
- Wang, X., Bove, A. M., Simone, G., & Ma, B. Molecular bases of VEGFR-2-mediated physiological function and pathological role. *Front. Cell Dev. Biol.* 8:599281, 2020.
- Webster, J. P., & Dubey, J. P. (2010). Toxoplasmosis of animals and humans. *Parasites & Vectors*, 3, 112. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-3-112>
- Xing, L., Tjarnlund, K., Lindqvist, B., et al. (2003). Structural analysis of human rhinovirus complexed with ICAM-1. *EMBO J.*, 22(8), 1967–1977.
- Xu, H. et al. (2020). Laminin-511 and $\alpha 6$ integrins regulate the expression of CXCR4 to promote endothelial morphogenesis. *J. Cell Sci.* 133:jcs246595. doi:10.1242/jcs.246595.
- Yamazaki, Y., et al. Identification of a VEGFR-binding protein in snake venom: a new role of myotoxic Lys49-PLA₂ as KDR antagonist. *J. Biol. Chem.* 280:29989–29992, 2005.
- Yang, Y., Jun, C.-D., Liu, J.-H., et al. (2004). Structural basis for dimerization of ICAM-1 on the cell surface. *Molecular Cell*, 14(2), 269–276. (PDB 1ZXQ; D3–D5).
- Zambelli, V. O., et al. (2017). Structural determinants of the hyperalgesic activity of myotoxic Lys49-phospholipase A2. *J. Venom Anim Toxins Incl Trop Dis*, 23, 7. <https://doi.org/10.1186/s40409-017-0099-6>
- Zhang, X.A. et al. (2002). Function of the tetraspanin CD151– $\alpha 6 \beta 1$ integrin complex in cell morphogenesis. *J. Cell Biol.* 158:1299–1309. doi:10.1083/jcb.200205010.
- Zhou, Z. et al. (2018). $\alpha 6$ -Integrin alternative splicing: distinct cytoplasmic variants in stem cells. *Stem Cell Res. Ther.* 9:204. doi:10.1186/s13287-018-0868-3.
- Zona Rubio, D. C., Aragón, D. M., & Almeida Alves, I. (2025). Innovations in Snake Venom-Derived Therapeutics: A Systematic Review of Global Patents and Their Pharmacological Applications. *Toxins*, 17(3), 136. <https://doi.org/10.3390/toxins17030136>