UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Interferência da BnSP-7, uma fosfolipase A_2 homóloga da peçonha de *Bothrops pauloensis*, na interação de *Leishmania (Leishmania) infantum* com macrófagos RAW 264.7

Patrícia Zati Ferreira

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

Uberlândia - MG
Julho - 2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Interferência da BnSP-7, uma fosfolipase A_2 homóloga da peçonha de *Bothrops pauloensis*, na interação de *Leishmania (Leishmania) infantum* com macrófagos RAW 264.7

Patrícia Zati Ferreira

Profa. Dra. Kelly Aparecida Geraldo Yoneyama Tudini
Me. Mônica Soares Costa

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

Uberlândia - MG
Julho - 2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Interferência da BnSP-7, uma fosfolipase A_2 homóloga da peçonha de *Bothrops pauloensis*, na interação de *Leishmania (Leishmania) infantum* com macrófagos RAW 264.7

Patrícia Zati Ferreira

Profa. Dra. Kelly Aparecida Geraldo Yoneyama Tudini
Instituto de Genética e Bioquímica

Me. Mônica Soares Costa
Instituto de Genética e Bioquímica

Homologado pela Coordenação do Curso de Ciências Biológicas em __/__/__

Profa. Dra. Celine de Melo

Uberlândia - MG
Julho – 2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Interferência da BnSP-7, uma fosfolipase A_2 homóloga da peçonha de *Bothrops pauloensis*, na interação de *Leishmania (Leishmania) infantum* com macrófagos RAW 264.7

Patrícia Zati Ferreira

Aprovado pela Banca Examinadora em: 12/07/2017 Nota: 100

_____

Profa. Dra. Kelly Aparecida Geraldo Yoneyama Tudini
Presidente da Banca Examinadora

Uberlândia, 12 de julho de 2017

Dedico este trabalho aos meus pais, Ivoney e Maria Helena, às minhas irmãs, Pollyanna e Pâmela, ao meu irmão, Leandro, e ao meu noivo, Antônio Cezar, que tanto apoiaram e incentivaram minha escolha profissional.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por ser minha base e sustentação em todos os momentos de minha vida, por tudo o que sou e por tudo o que tenho.

Aos meus pais, Ivoney e Maria Helena, por sempre me incentivarem e apoiarem em minhas escolhas, pelos conselhos, cuidado e amor incondicionais.

Às minhas irmãs, Pollyanna e Pâmela, por serem exemplos que me inspiraram a chegar até aqui. Em especial minha irmã gêmea, Pâmela, que gera em mim através da comparação, o incentivo para chegar mais longe. Ao meu irmão, Leandro, futuro cantor e compositor, por ser exemplo de persistência e de nunca desistir de seus sonhos.

Ao meu noivo, Antônio Cezar, por todas os momentos dedicados a me ouvir e aconselhar, e por me incentivar a nunca desistir dos meus sonhos e a alcançar meus objetivos.

À minha orientadora Profa. Dra. Kelly Aparecida Geraldo Yoneyama Tudini, pelo apoio e dedicação em todos os passos para realização deste trabalho, e em especial por me aceitar como sua orientanda. Sem você nada disso seria possível.

À minha coorientadora Me. Mônica Soares Costa, por todo o aprendizado que me proporcionou dentro do laboratório, pelo companheirismo, amizade e ajuda em todos os momentos. Obrigada por sempre ser solicita e prestativa nos momentos que precisei.

À Profa. Dra. Veridiana de Melo Rodrigues Ávila por ser responsável por gerar o encanto que tenho pela Bioquímica. Também agradeço por me receber no laboratório, sendo minha primeira orientadora, e mesmo depois de me afastar, ainda estar disposta a me receber e abrir as portas do laboratório.

À Profa. Dra. Renata Santos Rodrigues, pela orientação e ensinamento durante os meus primeiros meses de volta ao laboratório.

Agradeço à técnica Marina por estar sempre disposta a me ajudar e socorrer nos momentos de dúvidas, e por me ensinar sobre os equipamentos do laboratório.

Agradeço ao CNPq pela concessão das bolsas de iniciação científica que me permitiram entrar no meio científico.

E por fim, mas não menos importante, agradeço a toda equipe do LaBiTox, pois todos de certa forma, contribuíram para o meu aprendizado e formação. Em especial quero agradecer à Eloá, Vitor, Paulo e Isabela, pelo companheirismo e amizade, por momentos de diversão e distração, pelos ensinamentos e conselhos, e por trazerem ao laboratório risadas e bom humor, tornando o local de trabalho mais acolhedor.

RESUMO

A Leishmaniose é uma doença negligenciável na qual a busca por novos agentes terapêuticos é de grande relevância. Assim, este estudo objetivou analisar a interferência da toxina PLA_2-BnSP-7 isolada da peçonha de *Bothrops pauloensis* na interação de *Leishmania (Leishmania) infantum* com macrófagos de linhagem RAW264.7. Ensaios de citotoxicidade em parasitos e macrófagos cultivados em presença da PLA_2 revelaram valores de IC_{50} de 33,52μg/mL e 17,56μg/mL, respectivamente. Para avaliar a interferência da PLA_2 na interação parasito-hospedeiro foram avaliadas duas abordagens de tratamento do macrófago, tanto no processo de invasão quanto no de proliferação. Na primeira abordagem macrófagos tratados por 1h com PLA_2 foram incubados com parasito após a remoção da toxina, sendo observada reduções de 54% e 51% nos índices de infectividade, para invasão e proliferação, respectivamente. Na segunda abordagem macrófagos tratados com PLA_2 por 1h foram incubados com parasito em presença de toxina, sendo observada reduções de 55% e 32% nos índices de infectividade, para invasão e proliferação, respectivamente. Esses resultados demonstram o potencial da PLA_2-BnSP-7 em atuar como protótipo para o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos para leishmaniose.

Palavras-chave: *Leishmania (Leishmania) infantum*, infectividade, PLA_2-BnSP-7.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 1

2. MATERIAIS E MÉTODOS 12

2.1 Peçonha 12

2.2 Obtenção da PLA_2-BnSP-7 13

2.3 Confirmação da homogeneidade da PLA_2-BnSP-7: Eletroforese com agentes desnaturantes SDS-PAGE 12,5% 13

2.4 Cultura de promastigotas de *Leishmania (Leishmania) infantum* 14

2.5 Cultura de macrófagos de linhagem RAW 264.7 15

2.6 Efeito citotóxico da PLA_2-BnSP-7 15

2.6.1 Para as formas promastigota de Leishmania (Leishmania) infantum *16*

2.6.2 Para os macrófagos de linhagem RAW 264.7 ..... *16*

2.7 Determinação das concentrações inibitórias de 50% da viabilidade (IC_{50}) 16

2.8 Efeito da PLA_2-BnSP-7 na interação parasito-hospedeiro (modelo *in vitro*) 17

2.8.1 Tratamento dos macrófagos com a PLA_2-BnSP-7 ..... *17*

2.8.2 Ensaio de invasão em macrófagos de linhagem RAW 264.7 ..... *17*

2.8.3 Ensaio de infectividade (proliferação) em macrófagos de linhagem RAW 264.7 ..... *18*

2.9 Análises estatísticas 18

3. RESULTADOS 19

3.1 Obtenção e confirmação da homogeneidade da PLA_2-BnSP-7 19

3.2 Efeito da PLA_2-BnSP-7 na viabilidade de promastigotas de *L. (L.) infantum* e macrófagos RAW 264.7 20

3.3 Efeito da PLA_2-BnSP-7 na interação parasito-hospedeiro *in vitro*: invasão/proliferação 22

4. DISCUSSÃO 29

5. CONCLUSÃO 36

6. REFERÊNCIAS 37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classificação taxonômica do gênero *Leishmania* encontrado em humanos 3

Tabela 2. Efeitos farmacológicos e terapêuticos de toxinas isoladas de *Bothrops pauloensis*..9

Tabela 3. Índice de infectividade quanto à invasão de formas promastigota de *Leishmania (Leishmania) infantum* em macrófagos RAW 264.7 tratados com PLA_2-BnSP-7 25

Tabela 4. Índice de infectividade quanto à proliferação de formas promastigota de *Leishmania (Leishmania) infantum* em macrófagos RAW 264.7 tratados com PLA_2-BnSP-7 26

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Áreas com transmissão de Leishmaniose Visceral (LV) no Brasil 2

Figura 2. A - Inseto flebotomínio fêmea transmissor do parasito *Leishmania*. B - Formas promastigota do parasito *Leishmania*. C - Formas amastigota do parasito *Leishmania*..... 4

Figura 3. Ciclo de vida da *Leishmania* 6

Figura 4. Estrutura da PLA_2-BnSP-7, uma PLA_2-Lys49 dimérica, isolada da peçonha de *Bothrops pauloensis*..... 11

Figura 5. A. CM-Sepharose Fast Flow da peçonha bruta de *B. pauloensis*. **B.** Cromatografia RP-HPLC da fração CM5b. **C.** Eletroforese em gel de poliacrialamida SDS-PAGE 12,5% da purificação da PLA_2-BnSP-7 20

Figura 6. Efeito da PLA_2-BnSP-7, após 72h de incubação, em formas promastigota de *Leishmania (Leishmania) infantum* 21

Figura 7. Efeito da PLA_2-BnSP-7, após 4h e 24h de incubação, em macrófagos RAW 264..22

Figura 8. Efeito da PLA_2-BnSP-7 na interação de *Leishmania (Leishmania) infantum* com macrófagos RAW 264.7..... 23

Figura 9. Microscopia óptica de macrófagos RAW 264.7 infectados com promastigotas de *Leishmania (L.) infantum* (ensaio de invasão)..... 27

Figura 10. Microscopia óptica de macrófagos RAW 264.7 infectados com promastigotas de *Leishmania (L.) infantum* (ensaio de proliferação)..... 28

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

COX – cicloxigenase

CR – Receptor do complemento

IC_{50} – Concentração inibitória de 50%

IL- – Interleucina-

INF-γ – Interferon gama

iNOS – óxido nítrico-sintase induzida

LIT – Liver Infusion Triptose

LPS – lipopolissacarídeo

LV – Leishmaniose Visceral

MTT – (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide)

NO – óxido nítrico

OMS – Organização Mundial da Saúde

PBS – Tampão fosfato salino

PLA_2 – Fosfolipase A_2

SDS – Dodecilsulfato de sódio

SFB – Soro fetal bovino

TGF-β – Fator de transformação do crescimento beta

Th1 – T helper cells (células T auxiliares de tipo 1)

Th2 – T helper cells (células T auxiliares de tipo 2)

TNF-α – Fator de necrose tumoral alfa

1. INTRODUÇÃO

As Leishmanioses são antropozoonoses que representam um complexo de doenças causadas por protozoários do gênero *Leishmania*. A doença está entre as mais negligenciadas do mundo, afetando largamente a população, principalmente nos países em desenvolvimento. Mais de 350 milhões de pessoas no mundo estão expostas ao risco de contrair esta doença e estima-se que há cerca de 1,3 milhões de novos casos das diferentes formas clinicas ao ano (WHO; 2015).

A Leishmaniose pode apresentar diferentes formas clínicas, as quais se diferenciam pelos aspectos da doença, podendo acometer pele e/ou mucosas (Leishmaniose Tegumentar) e órgãos e tecidos internos (Leishmaniose Visceral ou Calazar) (NEVES, et al., 2011).

A Leishmaniose Visceral (LV), também conhecida como Calazar, é uma forma clínica que apresenta ampla distribuição mundial, ocorrendo em 70 países nos quatro continentes, a maioria dos quais classificados como países em desenvolvimento. Nesses locais existem cerca de 200 milhões de pessoas expostas ao risco de contrair a doença (NEVES, et al., 2011).

A LV é uma doença crônica, grave, de alta letalidade se não tratada, e que apresenta aspectos clínicos e epidemiológicos diversos, característicos de cada região onde ocorre. Estima-se uma incidência anual de 300 mil novos casos, dos quais cerca de 90% estão concentrados na Índia, Bangladesh, Nepal, Sudão do Sul, Etiópia e Brasil (NEVES, et al., 2011). Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), esta doença é responsável pela morte de milhares de pessoas em todo o mundo (cerca de 60 mil por ano), principalmente crianças, sendo classificada como a terceira enfermidade transmitida por vetores mais relevante da atualidade (WHO, 2010).

No Brasil, dados da OMS relatam a ocorrência média de aproximadamente 3.500 novos casos por ano, sendo que mais de 50% deles ocorrem em crianças menores de 10 anos. Desde

o advento de infecções pelo HIV e o aumento do uso de imunossupressores para transplante e quimioterapia, cerca de metade dos casos na Europa ocorrem agora em adultos.

Mais de 90% dos casos de LV relatados na América Latina ocorrem no Brasil, especialmente na região Nordeste. A doença é registrada em todas as regiões do país, sendo a região Sul a que apresenta menor número de casos notificados (Figura 1). Embora seja tipicamente rural, a doença pode ser adquirida em vilas ou em subúrbios de grandes cidades, onde as condições ambientais sejam favoráveis para o desenvolvimento do vetor.

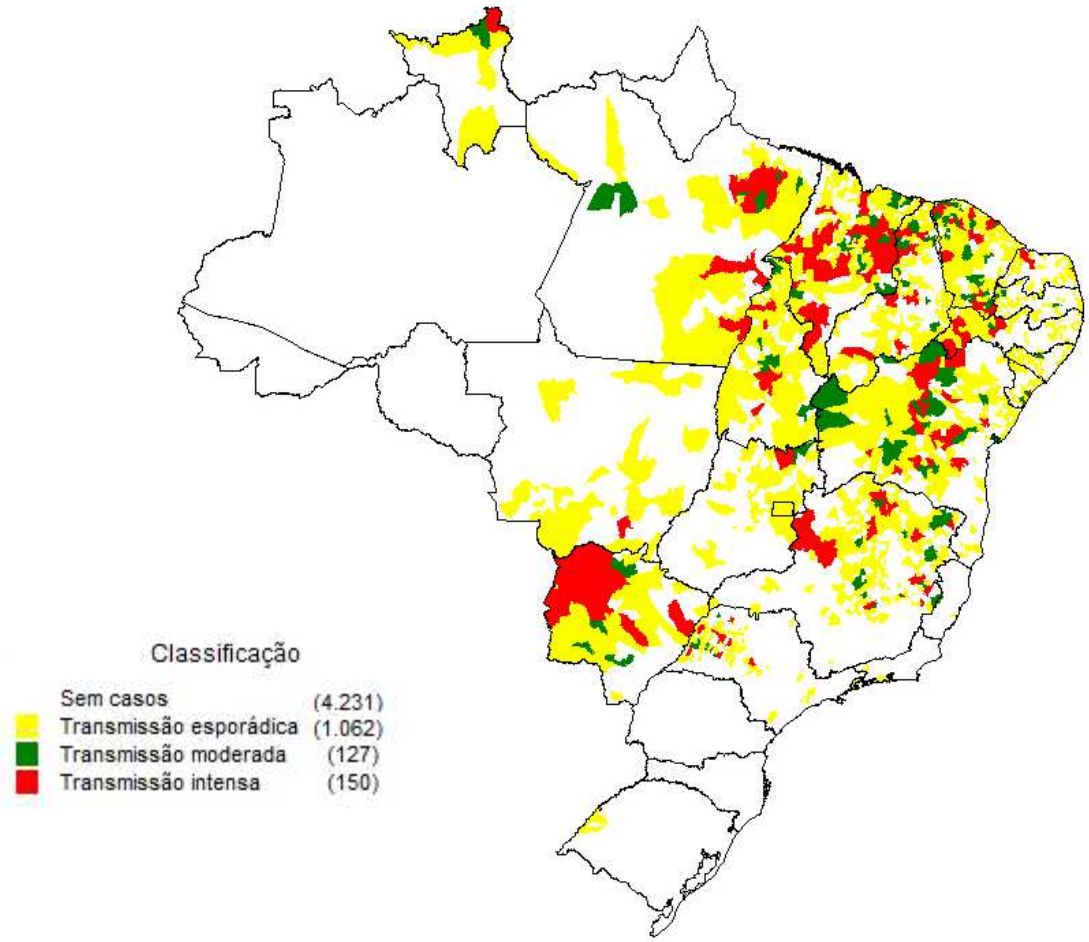


Figura 1. Áreas com transmissão de Leishmaniose Visceral (LV) no Brasil. Estratificação dos casos de Leishmaniose Visceral segundo município de residência e casos de 2013 a 2015. Fonte: (http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2017/marco/03/LV-Graficos-e-Mapas.pdf)

A identificação e classificação taxonômica do gênero *Leishmania* foi por muito tempo baseada nos aspectos clínicos apresentados pela doença. Com o passar do tempo, foram introduzidos parâmetros biológicos, epidemiológicos e de distribuição geográfica, associados aos aspectos clínicos. Em 1987, as linhagens de *Leishmania* que parasitam o homem foram classificadas em dois subgêneros (*Leishmania* e *Viannia*), de acordo com a sua localização no inseto vetor, a saber: subgênero *Leishmania*, quando o parasito se desenvolve no intestino anterior e médio do vetor; e subgênero *Viannia* quando o parasito se desenvolve na região posterior do intestino do inseto vetor (LAINSON; SHAW, 1987). *Viannia* são encontradas somente no Novo Mundo, e *Leishmania* são encontradas no Velho Mundo e no Novo mundo. A tabela 1 apresenta as espécies de *Leishmania* que parasitam humanos no Velho Mundo e no Novo Mundo, separados de acordo com seu subgênero *Leishmania* ou *Viannia* e o seu tropismo em relação ao corpo do hospedeiro. Esse tropismo será o responsável pelo tipo de Leishmaniose causada, Visceral, Tegumentar ou Mucocutânea (WHO, 2010).

Tabela 1. Classificação taxonômica do gênero *Leishmania* encontrado em humanos. Fonte modificada de WHO (2010).

Espécies de *Leishmania* encontrada em humanos				
Subgênero	*L. (Leishmania)*	*L. (Leishmania)*	*L. (Viannia)*	*L. (Viannia)*
Velho mundo	*L. donovani* *L. infantum*	*L. major* *L. tropica* *L. killicki* [a] *L. aethiopica* *L. infantum*		
Novo Mundo	*L. infantum*	*L. infantum* *L. mexicana* *L. pifanoi* [a] *L. venezuelensis* *L. garnhami* [a] *L. amazonensis*	*L. braziliensis* *L. guyanensis* *L. panamensis* *L. shawi* *L. naiffi* *L. lainsoni* *L. lindenbergi* *L. peruviana* *L. colombiensis* [b]	*L. braziliensis* *L. panamensis*
Principal tropismo	Viscerotropismo	*Dermotropismo*	*Dermotropismo*	Mucotropismo

[a] *Status* da espécie está em discussão
[b] Posição taxonômica está em discussão

Nas Américas, a LV é causada pela *Leishmania (Leishmania) infantum* e é uma zoonose que envolve animais silvestres e domésticos, como os canídeos, que atuam como reservatórios, e o homem, acometendo principalmente, o baço, o fígado, o linfonodo e a medula óssea.

A transmissão da Leishmaniose ocorre pela picada de insetos hematófagos pertencentes ao gênero *Lutzomya*, comumente conhecidos no Brasil por mosquito-palha, birigui e tatuquira (Figura 2A). A *Leishmania* possui duas formas principais: uma flagelada ou promastigota (Figura 2B), que se encontra livre no sistema digestório do inseto vetor e a forma contendo flagelo internalizado ou amastigota (Figura 2C), parasito intracelular obrigatório das células do sistema fagocítico mononuclear, encontrada nos tecidos dos hospedeiros vertebrados (BRASIL, 2007).

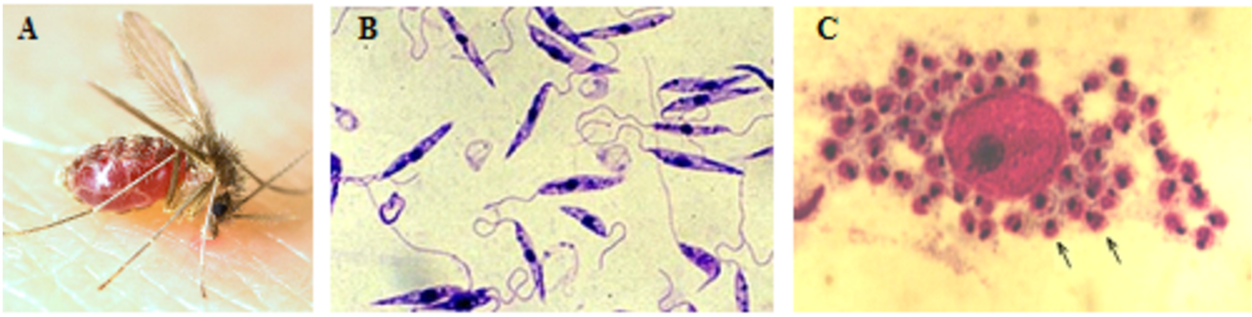


Figura 2. A - Inseto flebotomínio fêmea transmissor do parasito *Leishmania*. B - Formas promastigota do parasito *Leishmania*. C - Formas amastigota do parasito *Leishmania*.

Fontes: A. Foto de Ray Wilson, Liverpool School of Tropical Medicine. (doi:10.1371/image.ppat.v05.i08).

B. (http://fpslivroaberto.blogspot.com.br/2009/12/parasitas-leishmania-spp-e-leishmaniose.html).

C. (http://www.ufrgs.br/para-site/siteantigo/Imagensatlas/Protozoa/Leishmania.htm)

A forma promastigota sofre alterações e se torna altamente virulenta após sua migração para a probóscida do inseto vetor. Assim, após o repasto sanguíneo no hospedeiro vertebrado, essas formas altamente virulentas invadem os macrófagos e formam vacúolos parasitóforos

(fagossomos). Estes por sua vez, ao se fundirem com os lisossomos do macrófago, formam os fagolisossomos, onde a forma promastigota se diferencia em amastigota e inicia a multiplicação por divisão binária (Figura 3). No fagolisossomo, a forma promastigota necessita sobreviver ao ambiente de pH ácido e rico em proteases do hospedeiro, assim como sobreviver ao processo de fagocitose. Para isso, o parasito apresenta estratégias para gerar um compartimento intracelular ideal, promovendo inibição da síntese de radicais microbicidas, modulação da produção de citocinas (estímulo na produção de citocinas anti-inflamatórias), modulação da apoptose dos macrófagos, e inibição da apresentação de antígenos e da estimulação de células T (BOGDAN; ROLLINGHOFF, 1998, 1999).

A inoculação das formas infectantes é acompanhada da saliva do inseto vetor, que é rica em substâncias que promovem a atividade inflamatória, a qual será essencial para o aumento de células fagocitárias neste local e para a instalação da infecção. Após a inoculação, na LV, ocorre a migração dos parasitos para os linfonodos mais próximos, seguido da migração para as vísceras. A doença pode apresentar diversas formas clínicas, sendo esta determinada por fatores que envolvem a imunidade do hospedeiro, o tropismo preferencial do parasito no corpo do hospedeiro, a espécie de *Leishmania* infectante, podendo variar de uma forma silenciosa assintomática, uma forma aguda até a forma crônica (NEVES et al., 2011).

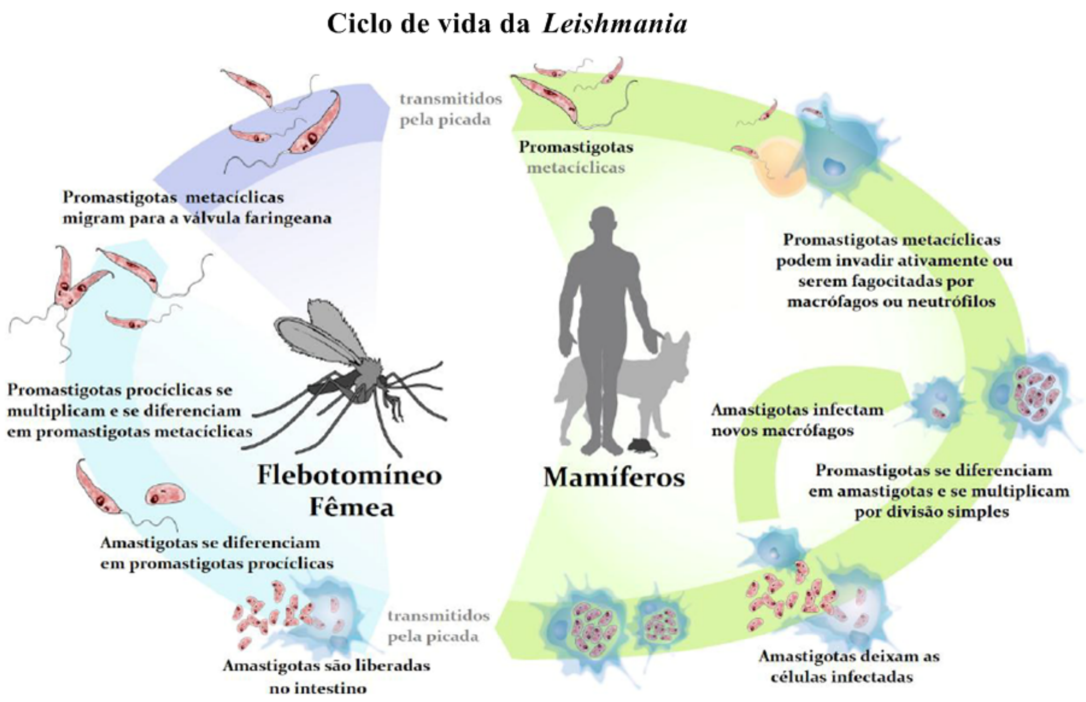


Figura 3. O inseto flebotomíneo fêmea, ao realizar o repasto sanguíneo, ingere células do hospedeiro infectadas com formas amastigota. No intestino médio do inseto vetor, formas amastigota diferenciam-se em promastigotas procíclicas e migram para a probóscida do mesmo, tornando-se promastigotas metacíclicas, altamente virulentas. Em um sucessivo repasto sanguíneo, promastigotas metacíclicas infectam hospedeiros mamíferos, invadindo ou sendo fagocitadas por macrófagos ou outras células do sistema fagocítico mononuclear. Dentro da célula hospedeira, promastigotas diferenciam-se em amastigotas e iniciam a multiplicação por divisão binária. O rompimento das células infectadas libera formas amastigota, as quais irão infectar novos macrófagos.

Fonte adaptado de: Trends in Parasitology, 2011, 27, 403-409. DOI: 10.1016/j.pt.2011.04.001 (http://dx.doi.org/10.1016/j.pt.2011.04.001)

A OMS e o Ministério da Saúde do Brasil recomendam para o tratamento da LV, os antimoniais pentavalentes como drogas de primeira, como o antimoniato de meglumina (Glucantime®), porém o tratamento prolongado pode causar uma série de efeitos colaterais, como cardiotoxicidade, nefrotoxicidade e hepatoxicidade. Além disso, há relatos de casos de resistência aos antimoniais, principalmente para a forma mucosa da doença (DE OLIVEIRA et al., 1995), o que nos faz repensar a necessidade de uso de drogas de segunda escolha, como

a anfotericina B e as pentamidinas. A primeira, porém, apresenta graves efeitos colaterais tais como insuficiência renal, alterações cardiológicas, anemia e outras alterações menos significativas (GONTIJO; DE CARVALHO, 2003; CROFT; COOMBS, 2003). Além disso, o uso deste medicamento deve ser realizado sob vigilância, em serviços especializados, em ambiente hospitalar. Desta forma, observa-se a necessidade de desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas.

Diversos agentes quimioterápicos com atividade anti-*Leishmania* tem sido buscados entre compostos naturais, como é o caso das peçonhas ofídicas e extratos de plantas. Grupos de pesquisa têm mostrado os efeitos que peçonhas ofídicas e suas toxinas purificadas apresentam sob o parasito *Leishmania*, tais como alterações em sua taxa de crescimento (COSTA et al., 2008; TORRES et al., 2010; STÁBELI et al., 2006; PEICHOTO et al., 2011; CISCOTTO et al., 2009; TEMPONE et al., 2001; RODRIGUES et al., 2009) e em seu potencial de infectividade na célula hospedeira (NUNES et al., 2013; PASSERO et al. 2008).

Venenos animais, como peçonhas ofídicas, têm sido alvo de vários estudos que demonstram o seu potencial terapêutico anti-*Leishmania*, anticancerígeno, antitrombótico, microbicida (PASSERO et al., 2008; COSTA et al., 2008; RODRIGUES et al., 2015; AZEVEDO et al. 2016), e seus efeitos tóxicos sob as células (FERNÁNDEZ et al., 2010). Entre as serpentes venenosas na América Latina, as serpentes do gênero *Bothrops* são responsáveis por aproximadamente 90% dos acidentes ofídicos (FERREIRA et al*.,* 1992; RIBEIRO et al., 1998).

As peçonhas das serpentes são um dos recursos mais concentrados de enzimas na natureza, e cuja composição se dá por misturas de proteínas, peptídeos e moléculas orgânicas pequenas cuja composição varia filogeneticamente, exibindo, globalmente, uma ampla gama de efeitos biológicos (CALDERON, et al., 2014). Elas são provavelmente as peçonhas mais complexas de todas as peçonhas animais conhecidas, contendo 20 ou mais componentes

diferentes. Mais de 90% do seu peso seco corresponde a proteínas, com uma grande variedade de enzimas (CALVETE et al., 2007). As diferentes proteínas dessas peçonhas possuem diversas aplicações farmacológicas. Da peçonha da *Bothrops pauloensis* já foram isoladas e caracterizadas toxinas de diferentes classes, como fosfolipases A_2 (PLA_2s), metaloproteinases, serino proteases, lectina do tipo C, entre outros (RODRIGUES et al., 2015). De acordo com Tempone et al. (2007), toxinas animais e seus derivados têm sido amplamente utilizados na descoberta de fármacos e têm conduzido ao desenvolvimento de muitos agentes terapêuticos. Recentemente nosso grupo de pesquisa apresentou uma revisão sobre as aplicações terapêuticas das diferentes toxinas isoladas da peçonha de *Bothrops pauloensis* (RODRIGUES et al., 2015) (Tabela 2).

As peçonhas de serpentes das famílias Colubridae, Elapidae e Viperidae constituem um grande recurso de PLA_2s (FRY; WUSTER, 2004). PLA_2s são enzimas de alto interesse médico-científico devido ao seu envolvimento em um grande número de doenças inflamatórias humanas, assim como, envenenamento por peçonha de serpentes e abelhas (COSTA et al., 2008). Estas enzimas são responsáveis por uma variedade de efeitos tóxicos e farmacológicos, dos quais, os mais comuns são: miotoxicidade e edema, indução ou inibição da agregação plaquetária, neurotoxicidade, efeito hipotensor, bactericida e citotoxicidade (FRANCISCHETTI et al., 1998; KINI, 2003; MASUDA et al., 2005; STÁBELI et al., 2006; RODRIGUES et al., 2007; SANTOS-FILHO et al., 2008; FERNÁNDEZ et al., 2010).

As PLA_2s são hidrolases cálcio dependentes responsáveis pela hidrólise de fosfolipídeos na membrana celular, especificamente na posição *sn*-2, liberando ácidos graxos livres e lisofosfolipídeos (ARNI; WARD, 1996; HIGUCHI et al., 2007; KINI, 2003). Essa hidrólise promove a perda da estrutura celular, prejudicando assim sua permeabilidade seletiva (BORGES et al., 2016). As PLA_2s são classificadas em 15 grupos, conforme a sua origem, massa relativa e quantidade de ligações dissulfetos (SCHALOSKE; DENNIS, 2006). Os

quatro tipos ou classes principais de PLA_2s são: PLA_2 secretada ($sPLA_2$), PLA_2 citosólica ($cPLA_2$), PLA_2 cálcio independente ($iPLA_2$) e PLA_2 lipoproteína associada (Lp- PLA_2) (BURKE; DENNIS, 2009).

Tabela 2. Efeitos farmacológicos e terapêuticos de toxinas isoladas de *Bothrops pauloensis*. Adaptada de Rodrigues, et al., 2015.

Classe	Toxina	Efeito Farmacológico	Efeito Terapêutico	Referências
PLA_2	BnSP-6	Miotoxicidade	Bactericia e Leishmanicida	Rodrigues, et al., 1998
PLA_2	BnSP-7	Miotoxicidade Neurotoxicidade Edematogênica	Bactericida e Leishmanicida	Rodrigues, et al., 1998 Nunes, et al., 2013
PLA_2	BnpTX-I e BnpTX-II	Citotoxidade	Bactericida	Rodrigues, et al., 2004
PLA_2	$BpPLA_2$	Miotoxidade e Edematogênica	-	Rodrigues, et al., 2007
PLA_2	$BpPLA_2TX$-I	Miotoxidade	Efeito anti-tumoral e inibição da agregação plaquetária	Ferreira, et al., 2013
Metaloprotease	Botropoidina	Miotoxidade hemorrágica	Inibição da agregação plaquetária	Gomes, et al., 2014
Metaloprotease	BpMP-I	Não hemorrágica	Fibrinogenolítica	Naves e Souza, et al., 2012
Metaloprotease	BpMP-II	Citotoxidade	Anti-angiogênica e Fibrinogenolítica	Ache, et al., 2014
Serino protease	BpSP-I	-	Desfibrinação	Costa, et al., 2009
Lectina tipo-C	BpLec	-	Bactericida e Anti-parasitária	Castanheira, et al., 2013
LAAO	Bp-LAAO	-	Bactericida, Leishmanicida, Anti-tumoral e Inibição da agregação plaquetária	Rodrigues, et al., 2009

As PLA_2s presentes nas peçonhas de serpentes são classificadas em dois grupos, I e II, os quais diferem entre si pela posição de resíduos de cisteína em sua sequência (HEINRIKSON

et al., 1977). As PLA_2s secretadas pertencem ao grupo II, e podem ser subdivididas de acordo com o aminoácido presente na posição 49 em: Asp49, que exibem um aspartato na posição 49 e possuem o sítio catalítico ativo; e Lys49, que exibem uma lisina na posição 49, com nenhuma ou baixa atividade catalítica. Esta falta de atividade catalítica pode estar associada à presença do aminoácido Lisina (Lys) localizado na posição 49, ocupada pelo Aspartato na PLA_2s-Asp49 (possui o sítio catalítico ativo ao qual o Ca^{2+} se liga), que não possui sítio catalítico ativo, o que impede a ligação ao cálcio, o qual desempenha um papel crucial para a atividade enzimática (ARNI; WARD, 1996; SOARES et al., 2004).

A BnSP-7, uma das seis PLA_2s isoladas da peçonha da *Bothrops pauloensis* (RODRIGUES, et al., 1998) é uma PLA_2-Lys49, sendo, portanto, cataliticamente inativa. Essa toxina possui uma massa molecular de aproximadamente 14 kDa e ponto isoelétrico de 8,8. A PLA_2-BnSP-7 (Figura 4), assim como a maioria das PLA_2s, é dimérica e apresenta estrutura idêntica a de outras PLA_2s-Lys49, com sete pontes dissulfeto e resíduos básicos e hidrofóbicos de aminoácidos, bem como um N- terminal composto por um resíduo de serina e resíduos de Gly30, His48, Asp99 conservados em sua estrutura (RODRIGUES et al., 1998; SOARES et al., 2000; MAGRO et al., 2003). Esta enzima está relacionada com várias ações farmacológicas, dentre as quais podemos citar: edema, necrose, inflamações e bloqueio neuromuscular. Entre seus efeitos terapêuticos estudados até o momento estão as ações bactericidas sobre *Escherichia coli* (RODRIGUES et al., 1998; SOARES et al., 2000; MAGRO et al., 2003); anti-*Toxoplasma*, reduzindo a adesão e proliferação de taquizoídes de *Toxoplasma gondii* em concentrações menores do que a necessária para causar citotoxicidade nas células hospedeiras (BORGES, et al., 2016), e anti-*Leishmania* (NUNES et al., 2013). Resultados obtidos em nosso Laboratório mostraram que as formas promastigosta de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* quando cultivados em presença da PLA_2-BnSP-7 apresentam uma redução na sua taxa de crescimento normal, alterações morfológicas e

redução na sua capacidade infectiva quando pré-tratado com a toxina antes do ensaio de infectividade (NUNES et al., 2013).

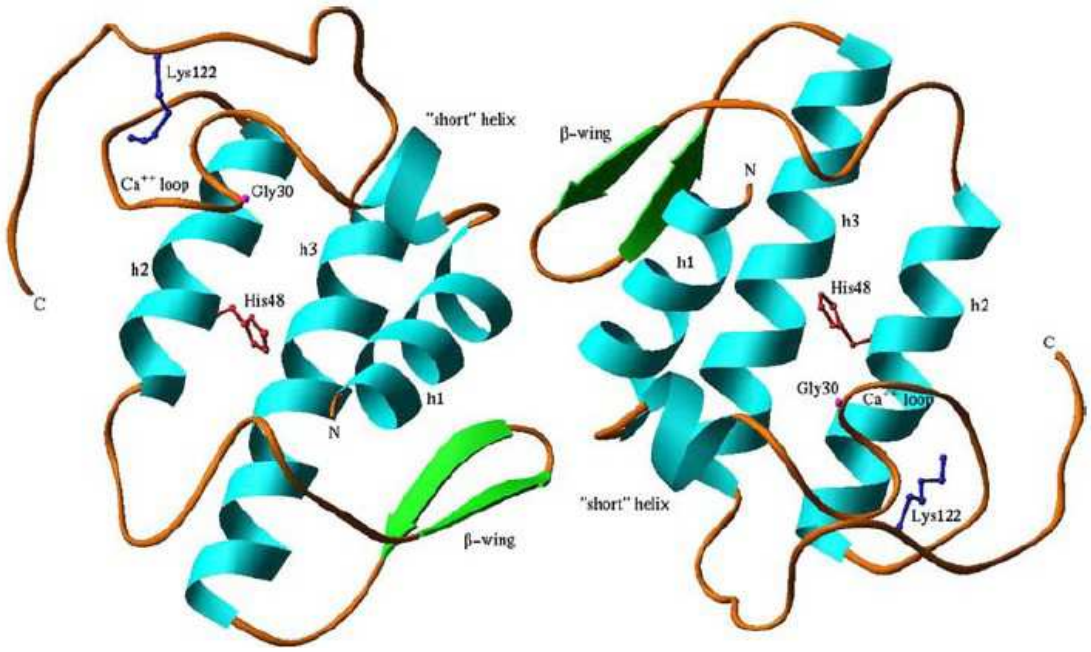


Figura 4. Estrutura da PLA_2-BnSP-7, uma PLA_2-Lys49 dimérica, isolada da peçonha de *Bothrops pauloensis*. A estrutura é composta de uma hélice N-terminal (**h1**); uma hélice curta (**"short" helix**); uma volta de ligação ao Ca^{+2} (**Ca^{++} loop**); duas hélices anti-paralelas, hélice 2 (**h2**) e hélice 3 (**h3**); duas folhas β-pregueada anti-paralelas (**β-wing**) e uma volta no C-terminal. Os resíduos de **Gly30**, **His48** e **Lys122** estão representados usando o modelo de esfera e bastão. Fonte: Magro, et al., 2003.

Diversos trabalhos têm demonstrado a presença de citocinas pró-inflamatórias no soro de humanos que sofreram envenenamento por *Bothrops*, e em modelos experimentais de envenenamento (BARRAVIEIRA et al., 1995; BARROS et al., 1998; CARDOSO, et al., 2001; CLISSA et al., 2001; CARNEIRO et al., 2002; RUCAVADO et al., 2002; CRUZ et al., 2005; CHAVES et al., 2005; FERNANDES et al., 2006; ZULIANI et al., 2005; ZAMUNER et al., 2005). Envenenamento causado pela peçonha de serpentes *Bothrops* são caracterizados por um dano tecidual local devido à mionecrose, hemorragia, edema e dano muscular agudo, que são sintomas correlacionados com as PLA_2s. Estudos de Oliveira et al. (2009) mostraram

que a inoculação de PLA_2-BnSP-7 no músculo gastrocnêmico de camundongos BALB/c causa mionecrose, seguido da invasão de um abundante infiltrado inflamatório, o qual está associado com a regeneração da região afetada do músculo após 2 semanas da exposição à toxina. Ainda, a PLA_2-BnSP-7 foi capaz de induzir um aumento de IL-6, IL-8 e IL-1β, e os níveis de citocinas induzidos pela toxina foram comparáveis aos observados após a inoculação do veneno bruto, sugerindo um importante papel desta PLA_2 no processo inflamatório devido à indução na produção de citocinas pró-inflamatórias durante o envenenamento ofídico, que contribuiria para a evolução do dano tecidual local e regeneração.

Com base nas atividades biológicas da PLA_2-BnSP-7, este trabalho teve como intenção avaliar o efeito que a toxina exerce sobre a célula hospedeira frente ao processo de invasão e proliferação de promastigotas de *L. (L.) infantum*. Como descrito anteriormente, durante o processo de infectividade o parasito modula a produção de citocinas na célula hospedeira de modo a impedir o processo inflamatório e gerar um ambiente propício ao seu desenvolvimento. Desse modo, acreditamos que o estimulo pró-inflamatório decorrente da ação da PLA_2 resultaria em um ambiente hostil para o estabelecimento do parasito (invasão), bem como para o seu desenvolvimento no interior da célula hospedeira (proliferação), o que promoveria o controle do processo de infecção do parasito nas células do hospedeiro.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Peçonha

O projeto apresenta o Certificado de Autorização de Acesso e de Remessa de Amostra de componente do Patrimônio Genético sob nº 010333/2015-0. A peçonha bruta de *Bothrops pauloensis* foi obtida a partir de espécimes mantidas no Serpentário CETA - Centro de Extração de Toxinas Animais Ltda - Morungaba, SP. Este serpentário possui comprovante de

registro no Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (nº de cadastro: 2087163).

2.2 Obtenção da PLA_2-BnSP-7

A PLA_2-BnSP-7 foi purificada de acordo com Rodrigues et al. (1998) com algumas modificações. Aproximadamente 200 mg da peçonha bruta de *B. pauloensis* foram dispersos em 2,0 mL de bicarbonato de amônio 0,05 M, pH 7,8 e centrifugados a 100 x g, por 10 minutos em 4°C. O sobrenadante foi aplicado à coluna de CM-Sepharose *Fast Flow* equilibrada com o tampão de equilíbrio (bicarbonato de amônio 0,05 M, pH 7,8). A amostra foi eluída em temperatura ambiente utilizando um gradiente convexo de concentração contendo bicarbonato de amônio 0,05 M a 0,5 M, pH 7,8. Foram coletados 1,0 mL/tubo das frações num fluxo de 6,5 mL/hora, monitoradas por meio de espectrofotômetro Ultrospec 1000 (Amersham Pharmacia Biotech). A absorbância de cada fração foi lida a 280 nm. A fração contendo a PLA_2-BnSP-7 foi liofilizada e armazenada a -20°C para ser analisada quanto à homogeneidade em um sistema de cromatografia RP-HPLC em uma coluna C18 (GE HealthCare). A coluna foi equilibrada com solvente A (4% acetonitrila e 0,1% ácido trifluoracético) e eluída com um gradiente de concentração linear do solvente B (80% acetonitrila e ácido trifluoracético 0,1%) de 0% a 100% a um fluxo de 0,5 mL/min por 33min. O pico único de ABS 280 nm foi liofilizado e armazenado a -20°C para testes subsequentes. A determinação da concentração de proteínas foi realizada pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976).

2.3 Confirmação da homogeneidade da PLA_2-BnSP-7: Eletroforese com agentes desnaturantes SDS-PAGE 12,5%

A fração contendo a PLA_2-BnSP-7 obtida nas cromatografias foi submetida a análise em gel de poliacrilamida 12,5% (m/v) em condições desnaturantes e redutoras, na presença de SDS e β-mercaptoetanol, respectivamente, segundo a metodologia descrita por Laemmli (1970). O sistema de SDS-PAGE descontínuo consistiu de: gel de empilhamento a 3%, contendo Tris-HCl 0,5 M (pH 6,8) e SDS a 0,1% e gel de separação a 12,5% contendo Tris-HCl 2,0 M pH 8,8 e SDS 0,1%, mantendo a relação de Bis:Acrilamida 0,8:30. O gel foi preparado em um sistema de eletroforese Hoefer SE 260 Mighty Small II Mini-Vertical.

Amostras contendo 10 μg de proteínas foram dissolvidas em tampão contendo Tris-HCl 0,0625 M (pH 6,8); glicerol a 10% (v/v); β-mercaptoetanol 5% (v/v); 2% de SDS e 0,001% de azul de bromofenol como corante. As soluções foram aquecidas a 100ºC por 5 minutos e aplicados nos poços do gel. O tampão do eletrodo continha Tris 0,025 M, Glicina 0,192 M e SDS 0,1% (m/v), pH 8,3. Os géis foram corados com uma solução contendo 0,2 g de Comassie brilhante R-250, 50 mL de metanol, 40 mL de água destilada e 10 mL de ácido acético. Posteriormente, os géis foram descorados com uma solução contendo ácido acético 10% (v/v) e etanol 30% (v/v). Como marcador de massa molecular foi utilizado uma solução contendo proteínas com massa molecular de 116 kDa, 66,2 kDa; 45 kDa; 35 kDa; 25 kDa; 18,4 kDa, e 14,4 kDa, respectivamente.

2.4 Cultura de promastigotas de *Leishmania (Leishmania) infantum*

Em câmaras B.O.D foram cultivadas formas promastigota de *Leishmania (Leishmania) infantum* a 23°C em meio LIT (*Liver Infusion Tryptose*) contendo penicilina (100 UI/mL) e estreptomicina (100 μg/mL), e suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) inativado pelo calor (LIT completo). Os parasitos foram repicados após a entrada na fase estacionária de crescimento, e para garantir que os ensaios fossem realizados com parasitos com alta capacidade de infecção, os experimentos com a forma promastigota foram realizados com

parasitos de baixa passagem em meio de cultura.

2.5 Cultura de macrófagos de linhagem RAW 264.7

Em estufa contendo 5% de CO_2 foram cultivados macrófagos de linhagem RAW 264.7 a 37ºC em meio RPMI-1640 (Sigma) suplementado com L- glutamina 2 mM, piruvato de sódio 2 mM (Sigma), MEM 1 mM (Sigma), penicilina/streptomicina 0,1%, Hepes 25 mM e SFB 10% (RPMI completo).

Para o repique da célula, o meio metabolizado presente na garrafa foi descartado e a garrafa lavada rapidamente com 5 mL de PBS. Em seguida foi adicionado 2 mL de tripsina 0,2% EDTA (Sigma) aquecida e a garrafa foi incubada a 37ºC por alguns minutos, para o desprendimento das células. O conteúdo da garrafa foi ressuspendido em 8 mL de PBS com 10% de SFB e transferido para um tubo falcon de 15 mL, o qual foi centrifugado a 200 g por 7 minutos a 24ºC. O sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspendido em 1 mL de meio RPMI completo e colocado na garrafa de 75cm^2 com 14 mL do meio de RPMI completo. A garrafa foi incubada a 37ºC e 5% CO_2.

2.6 Efeito citotóxico da PLA_2-BnSP-7

A PLA_2-BnSP-7 purificada e liofilizada foi dissolvida em DMSO, e mantida a -20ºC. Para a realização dos experimentos, novas diluições foram preparadas, em meio de cultura, para que a concentração de DMSO no meio de cultura não excedesse 0,1%, uma concentração inferior à tóxica para a célula. O efeito da PLA_2-BnSP-7 sobre a viabilidade celular em formas promastigota de *L. (L.) infantum* e em macrófagos RAW 264.7 foi avaliado pela oxidação mitocondrial do reagente MTT [do inglês, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)] (Sigma), de acordo com Mosmann (1983), com algumas modificações.

2.6.1 Para as formas promastigota de *Leishmania (Leishmania) infantum*

Formas promastigota de *Leishmania* (5 x 10^5 parasitos/poço) foram adicionadas em placa de 96 poços em meio LIT completo contendo concentrações crescentes de PLA_2s (0,097 µg/mL - 200 µg/mL) por 72h a 23°C. Após 72h, 20 µL de reagente MTT (5 mg/mL) foi adicionado em cada poço, e a placa foi incubada, sob proteção da luz, na estufa de CO_2 durante um período de 3h. Decorrido este tempo, os cristais de Formazan foram solubilizados com 100 µL de PBS contendo SDS 10% (m/v) e HCl 10 mM. No dia seguinte, a absorbância foi então mensurada a 570 nm. Cada ensaio foi desenvolvido em triplicata e 3 experimentos independentes foram realizados.

2.6.2 Para os macrófagos de linhagem RAW 264.7

Macrófagos RAW 264.7 (1 x 10^5 células/poço) foram adicionados em poços de placas de 96 poços contendo 100 µL de meio RPMI completo e mantidos a 37°C em incubadora contendo 5% de CO_2 por 18h para adesão. No dia seguinte, o meio metabolizado foi retirado e os poços foram lavados com PBS para retirada dos macrófagos não aderidos. Concentrações crescentes da PLA_2-BnSP-7 (0,09 µg/mL - 200 µg/mL) foram adicionadas aos poços e os macrófagos foram mantidos por 4h e 24h a 37°C e 5% de CO_2. Após 4h e 24h horas de incubação, 20 µL de reagente MTT (5 mg/mL) foi adicionado em cada poço e a placa foi mantida em estufa por mais 3h, sob proteção da luz. Finalmente, 100 µL de PBS contendo SDS 10% (m/v) e HCl 10 mM foram adicionados em cada poço para a dissolução dos grânulos de Formazan precipitados. No dia seguinte, a absorbância foi mensurada a 570 nm. Cada ensaio foi desenvolvido em triplicata e 2 experimentos independentes foram realizados.

2.7 Determinação das concentrações inibitórias de 50% da viabilidade (IC_{50})

As concentrações inibitórias de 50% (IC_{50}) da viabilidade de promastigotas de *L. (L.) infantum* e macrófagos RAW 264.7 foram determinadas a partir da curva concentração-efeito

do ensaio de viabilidade (item 2.6). Para análise dos dados obtidos nesse ensaio foi utilizado o software GraphPad Prism 5.0.

2.8 Efeito da PLA_2-BnSP-7 na interação parasito-hospedeiro (modelo *in vitro*)

2.8.1 Tratamento dos macrófagos com a PLA_2-BnSP-7

Foram realizadas duas abordagens de tratamento, descritas a seguir:

1ª Abordagem: Macrófagos foram incubados previamente com concentração 14 μg/mL da PLA_2-BnSP-7 por 1 hora. Após esse período, a toxina foi removida por lavagens com PBS, seguido do uso destes macrófagos nos ensaios de invasão/proliferação.

2ª Abordagem: Macrófagos foram incubados previamente com concentração 14 μg/mL da PLA_2-BnSP-7 por 1 hora, e então utilizados em ensaios de invasão/proliferação, sem que houvesse a remoção da toxina.

2.8.2 Ensaio de invasão em macrófagos de linhagem RAW 264.7

Macrófagos (2,5 x 10^5/poço) foram adicionados em lamínulas de 13mm dispostas em poços de placas de 24 poços e mantidos em meio RPMI completo à 37°C, 5% de CO_2 por 18h para adesão. Decorrido este tempo, os poços foram lavados em PBS para retirada dos macrófagos não aderidos. Após os tratamentos dos macrófagos com PLA_2-BnSP-7 conforme descrito no item 2.8.3, formas promastigota de *L. (L.) infantum* foram adicionadas nas lamínulas contendo macrófagos na proporção de 10 parasitos por macrófago (10:1). As lamínulas contendo macrófagos e parasitos foram incubadas em temperatura ambiente durante 3h. Parasitos não aderidos aos macrófagos foram removidos por meio de sucessivas lavagens das lamínulas com meio RPMI. As lamínulas foram fixadas com paraformaldeído 1% em PBS e coradas por Giemsa modificado. A determinação dos índices de invasão foi calculada por meio da multiplicação da média do número de parasitos/macrófago pela porcentagem de macrófagos infectados. Foram contados às cegas pelo menos 100 macrófagos por lamínula,

em triplicata. Foram realizados 2 experimentos independentes.

2.8.3 Ensaio de infectividade (proliferação) em macrófagos de linhagem RAW 264.7

Macrófagos (1 x 10^5/poço) foram adicionados em lamínulas de 13mm dispostas em poços de placas de 24 poços e mantidos em meio RPMI completo à 37°C, 5% de CO_2 por 18h para adesão. Após a adesão os poços foram lavados com PBS para retirada dos macrófagos não aderidos. Após os tratamentos dos macrófagos com PLA_2-BnSP-7 conforme descrito no item 2.8.3, formas promastigota de *L. (L.) infantum* foram adicionadas nas lamínulas contendo macrófagos na proporção de 10 parasitos por macrófago (10:1). As lamínulas contendo macrófagos e parasitos foram incubadas em temperatura ambiente durante 3h. Parasitos não aderidos aos macrófagos foram removidos por meio de sucessivas lavagens das lamínulas com meio RPMI. Os macrófagos infectados foram mantidos em meio RPMI completo por 24 horas, em estufa de CO_2 a 37ºC. As lamínulas foram fixadas com paraformaldeído 1% em PBS e coradas por Giemsa modificado. A determinação dos índices de infectividade (proliferação) foi calculada por meio da multiplicação da média do número de parasitos/macrófago pela porcentagem de macrófagos infectados. Foram contados às cegaspelo menos 100 macrófagos por lamínula, em triplicata. Foram realizados 2 experimentos independentes.

2.9 Análises estatísticas

Por meio do teste Análise de Variância (ANOVA), comparações das diferenças entre as médias foram realizadas para análise dos dados, utilizando-se Bonferroni quando apropriado. As diferenças foram consideradas significativas quando $p<0.05$.

3. RESULTADOS

3.1 Obtenção e confirmação da homogeneidade da PLA_2-BnSP-7

Inicialmente, 200 mg da peçonha de *B. pauloensis* foram fracionados em coluna cromatográfica contendo resina de troca iônica CM-Sepharose *Fast Flow*. Foram obtidas seis frações principais (CM1, CM2, CM3, CM4, CM5a e CM5b) (Figura 5A). De acordo com experimentos realizados anteriormente em nosso laboratório, a fração CM5b corresponde à fração que contêm a fosfolipase de interesse, BnSP-7. A fração de CM5b foi então liofilizada e armazenada a -20°C para análise quanto à homogeneidade no sistema de cromatografia RP-HPLC em uma coluna C18 (GE HealthCare). O sistema de fase reversa permitiu a purificação da PLA_2-BnSP-7 (Figura 5B), e a sua homogeneidade foi confirmada pelo gel SDS-PAGE 12,5% corado com *Coomassie Blue* coloidal (2% (m/v) *Coomassie* G-250). Esta fração revelou uma banda majoritária com peso molecular em torno de 14,4 kDa, não demonstrando a presença de contaminantes (Figura 5C).

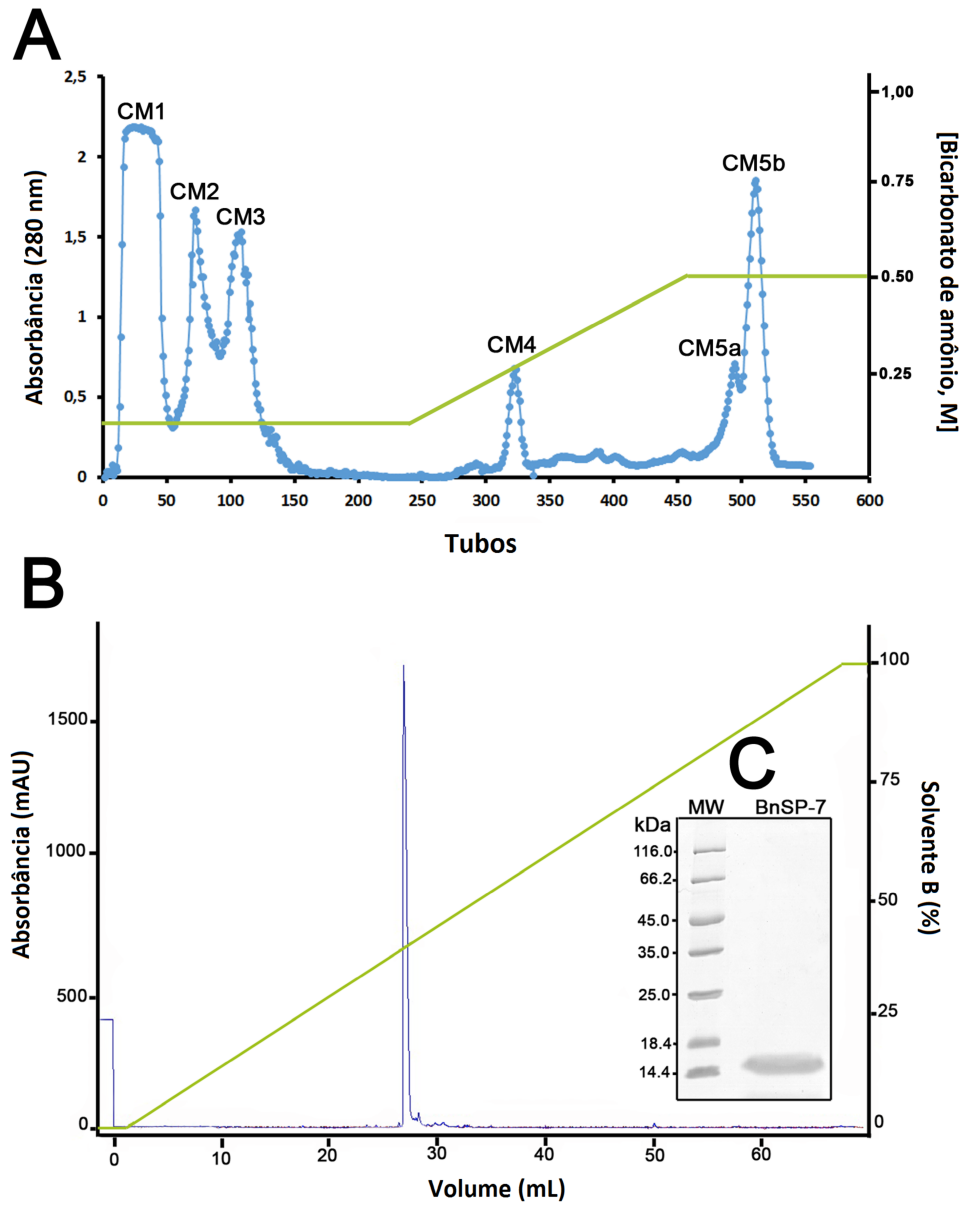


Figura 5. A. CM-Sepharose Fast Flow da peçonha bruta de *B. pauloensis*, apresentando 6 picos referentes às frações CM1, CM2, CM3, CM4, CM5a e CM5b. **B.** Cromatografia RP-HPLC da fração CM5b, contendo a PLA_2-BnSP-7. **C.** Eletroforese em gel de poliacrialamida SDS-PAGE 12,5% da purificação da PLA_2-BnSP-7, apresentando peso molecular em torno de 14,4 kDa.

3.2 Efeito da PLA_2-BnSP-7 na viabilidade de promastigotas de *L. (L.) infantum* e macrófagos RAW 264.7

Formas promastigota de *Leishmania* e macrófagos RAW 264.7 foram incubados com diferentes concentrações de PLA_2-BnSP-7 (200 µg/mL, 100 µg/mL, 50 µg/mL, 25 µg/mL,

12,5 µg/mL, 6,25 µg/mL, 3,12 µg/mL, 1,56 µg/mL, 0,78 µg/mL, 0,39 µg/mL, 0,19 µg/mL e 0,09 µg/mL). A análise das curvas dose-resposta mostrou que a PLA_2-BnSP-7alterou a viabilidade do promastigota (Figura 6B) após 72h de incubação, bem como a viabilidade dos macrófagos (Figura 7B) após 4h e 24h de incubação. A análise do gráfico de viabilidade para as formas promastigota de *Leishmania* (Figura 6A), mostra que as concentrações abaixo de 50 µg/mL apresentaram efeito citotóxico significativo em relação ao controle (parasitos incubados por 72h na ausência de toxina). No entanto, os gráficos de viabilidade dos macrófagos mostram que o tratamento com a toxina promove um efeito citotóxico significativo em relação ao controle em todas as concentrações e acima de 12,5 µg/mL, para os tempos de 4h (Figura 7A) e 24h (Figura 7C), respectivamente. Através do teste de citotoxicidade, calculamos a concentração inibitória de 50% (IC_{50}) da citotoxicidade das formas promastigota de *Leishmania*, obtendo um valor de 33,52 µg/mL. No entanto, o valor obtido da concentração inibitória de 50% (IC_{50}) da citotoxicidade dos macrófagos RAW 264.7 para o período de 4h foi de 26,43 µg/mL, e para o período de 24h foi de 17,56 µg/mL.

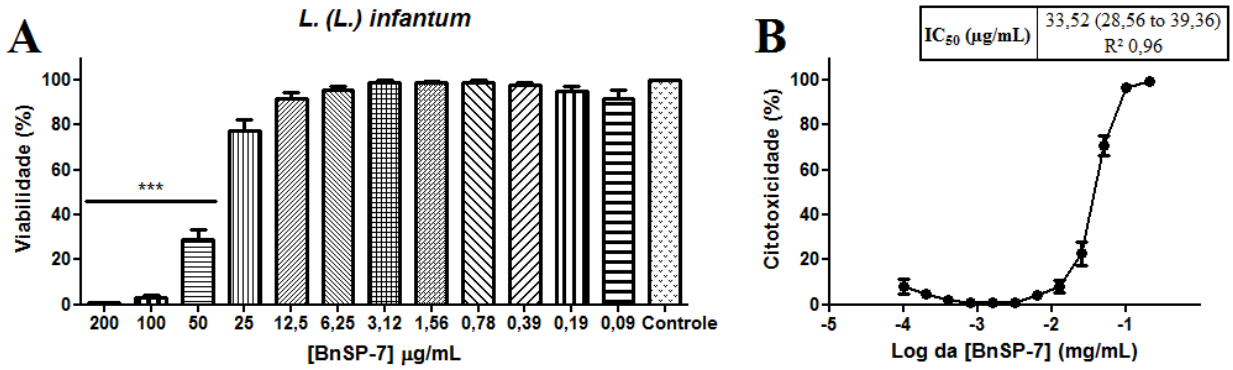


Figura 6. Efeito da PLA_2-BnSP-7, após 72h de incubação, sobre formas promastigota de *Leishmania (Leishmania) infantum*. O gráfico **A** mostra a porcentagem de viabilidade em relação ao controle (parasitos incubados por 72h na ausência de toxina) para as diferentes concentrações de toxina (200 – 0,09 µg/mL). O gráfico **B** mostra a curva concentração-resposta resultante do ensaio de citotoxicidade por MTT. A análise dos dados revelou um valor de IC_{50} de 33,52 µg/mL. *** Variação estatisticamente significativa quando comparado ao controle ($p < 0,0001$).

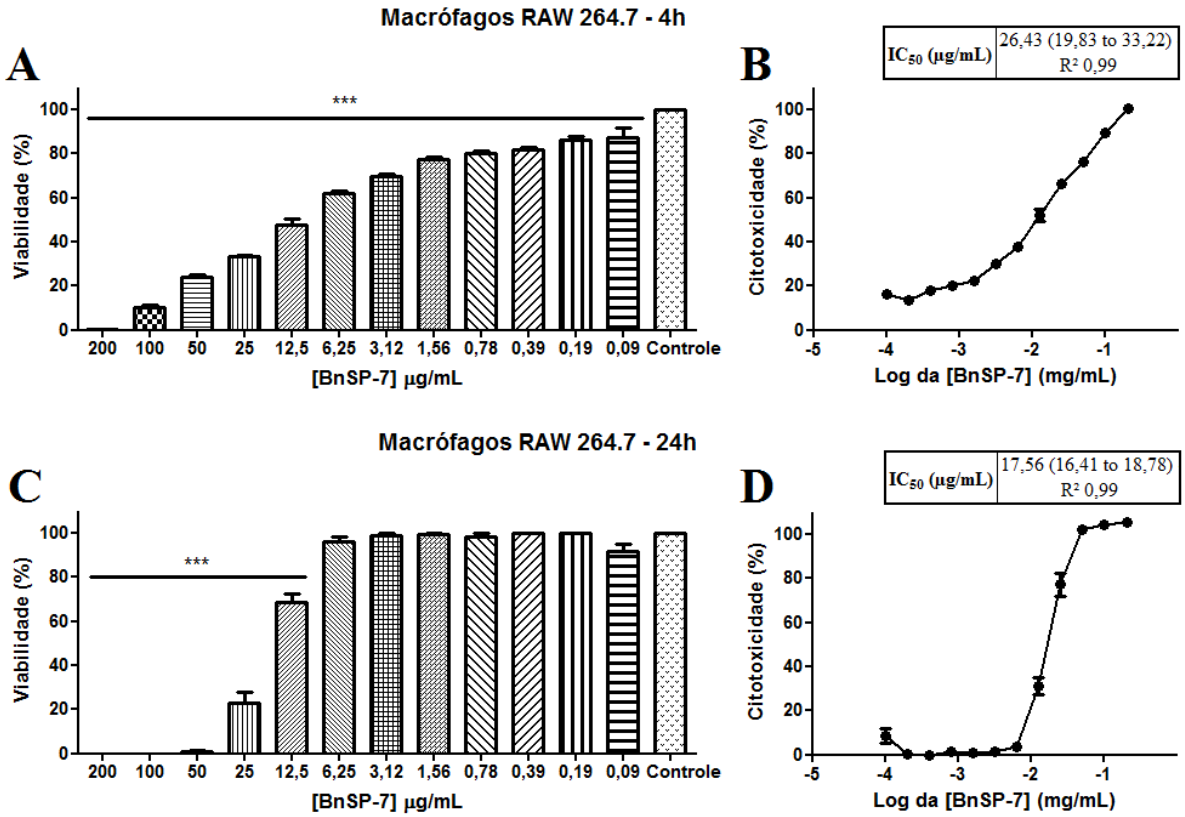


Figura 7. Efeito da PLA_2-BnSP-7, após 4h e 24h de incubação, em macrófagos RAW 264.7. O gráfico **A** mostra a porcentagem de viabilidade em relação ao controle (macrófagos incubados por 4h na ausência de toxina) para as diferentes concentrações de toxina (200 – 0,09 µg/mL). O gráfico **B** mostra a curva concentração-resposta resultante do ensaio de citotoxicidade por MTT para o tempo de incubação de 4h. A análise dos dados revelou um valor de IC_{50} de 26,43 µg/mL. O gráfico **C** mostra a porcentagem de viabilidade em relação ao controle (macrófagos incubados por 24h na ausência de toxina) para as diferentes concentrações de toxina (200 – 0,09 µg/mL). O gráfico **D** mostra a curva concentração-resposta resultante do ensaio de citotoxicidade por MTT para o tempo de incubação de 24h. A análise dos dados revelou um valor de IC_{50} de 17,56 µg/mL. *** Variação estatisticamente significativa quando comparado ao controle ($p < 0,0001$).

3.3 Efeito da PLA_2-BnSP-7 na interação parasito-hospedeiro *in vitro*: invasão/proliferação

Para avaliar a interferência da toxina na interação parasito-macrófago (ensaios de

invasão/proliferação) a concentração de 14 µg/mL de toxina foi utilizada nos experimentos, seguindo dois tipos de abordagens de tratamento, conforme descrito em materiais e métodos (item 2.8.3).

A porcentagem de inibição da invasão e da proliferação foi estabelecida a partir da comparação com os controles (macrófagos incubados na ausência de toxina) (Figura 8). O ensaio de invasão do parasito revelou uma redução estatisticamente significativa de aproximadamente 54% e de 55% nos índices de infectividade (invasão), quando comparado ao controle, para a 1ª e 2ª abordagens de tratamento, respectivamente. Com relação ao ensaio de proliferação, a 1ª abordagem de tratamento resultou em uma redução de 51% no índice de infectividade (proliferação), enquanto que para a 2ª abordagem de tratamento foi observada uma redução de 32% no índice de infectividade (proliferação). As reduções nos índices de infetividade (proliferação) também foram calculadas com relação ao controle, apresentando uma variação estatisticamente significativa em ambas às abordagens.

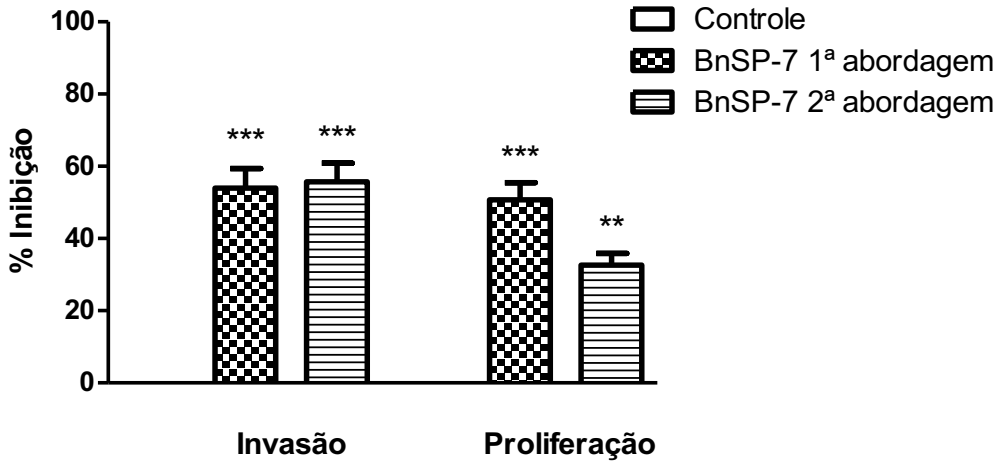


Figura 8. Efeito da PLA_2-BnSP-7 na interação de *Leishmania (Leishmania) infantum* com macrófagos RAW 264.7. O gráfico mostra as porcentagens de inibição de invasão e proliferação, de formas promastigota calculadas com base nos índices de invasão e proliferação em comparação aos controles, seguindo as duas abordagens de tratamento. Controle (macrófagos incubados na ausência de toxina) foram considerados como apresentando 0% de inibição. ** Redução estatisticamente significativa quando comparado ao controle ($p < 0,005$). *** Redução estatisticamente significativa quando comparado ao controle ($p < 0,0001$).

A análise dos dados da Tabela 3 mostra que o tratamento dos macrófagos com a PLA_2-BnSP-7 no ensaio de invasão causou uma redução significativa na porcentagem de macrófagos infectados, e consequentemente, no índice de infectividade (invasão), quando comparado ao controle, em ambas as abordagens de tratamento. Os macrófagos tratados com a toxina seguindo a 1ª abordagem de tratamento exibiram 31% de células infectadas pelo parasito, enquanto que em macrófagos incubados na ausência de toxina (controle) 58% das células estavam infectadas por parasitos. Quanto à 2ª abordagem de tratamento, 29% das células foram infectadas pelo parasito, enquanto que o controle apresentou em torno de 55% de macrófagos infectados. A análise dos dados da média do número de parasitos por macrófago infectado mostrou que na 1ª abordagem de tratamento a média de parasitos/macrófago foi de 1,84, não sendo observada diferença estatisticamente significativa em relação ao controle (2,12 parasitos/macrófago). Na 2ª abordagem de tratamento a média de parasitos/macrófago foi de 1,91, enquanto que o controle apresentou média de 2,31 parasitos/macrófago, e também neste caso, não houve diferença estatisticamente significativa. Embora não tenha sido observada diferença estatisticamente significativa, convém ressaltar que as médias de número de parasitos/macrófago para ambas as abordagens de tratamento foi menor que as médias dos controles.

Com relação ao ensaio de proliferação, a análise dos dados exibidos na Tabela 4 mostrou que a PLA_2-BnSP-7 causou uma redução estatisticamente significativa na porcentagem de macrófagos infectados quando comparado ao controle, para ambas as abordagens de tratamento. Aproximadamente 34% e 37% dos macrófagos foram infectados pelo parasito, na 1ª e 2ªabordagens de tratamento, respectivamente, enquanto que o controle exibiu 61% de macrófagos infectados. Com relação à média de parasitos por macrófago infectado, a 1ª abordagem resultou em média de parasitos/macrófago de 2,02, enquanto que o controle exibiu

média de 2,27 parasitos/macrófago. Para este dado não houve diferença estatisticamente significativa em relação ao controle. Por outro lado, a 2ª abordagem de tratamento resultou em média de 2,50 parasitos/macrófago e, comparando com o controle, foi verificada diferença estatisticamente significativa.

Tabela 3. Índice de infectividade quanto à invasão de formas promastigota de *Leishmania (Leishmania) infantum* em macrófagos RAW 264.7 tratados com PLA_2-BnSP-7. Os macrófagos foram tratados com a toxina durante 1 hora, e após este período, a toxina foi retirada (1ª abordagem) e mantida (2ª abordagem). As células ativadas foram então infectadas com a forma promastigota durante o período de 3h para invasão do parasito.

1ª abordagem	Índice de infectividade (invasão) [a]	Macrófagos infectados (%) [a]	Número de parasitos / macrófagos infectados [a]
Complexo	*L. (L.) infantum*	*L. (L.) infantum*	*L. (L.) infantum*
Controle	124.0 (±5.29)	58.33 (±1.90)	2.12 (±0.04)
BnSP-7	58.17 (±8.37)***	31.00 (±2.33)***	1.84 (±0.18)
2ª abordagem	Índice de infectividade (invasão) [a]	Macrófagos infectados (%) [a]	Número de parasitos / macrófagos infectados [a]
Complexo	*L. (L.) infantum*	*L. (L.) infantum*	*L. (L.) infantum*
Controle	128.3 (±8.33)	55.17 (±1.16)	2.31 (±0.11)
BnSP-7	57.00 (±8.02)***	29.17 (±1.75)***	1.91 (±0.16)

[a] Os resultados são expressos como a media e o desvio padrão (± SD) de dois experimentos independentes, cada um realizado em triplicata.

*** Redução estatisticamente significativa quando comparado com o controle ($p < 0,0001$)

Tabela 4. Índice de infectividade quanto à proliferação de formas promastigota de *Leishmania (Leishmania) infantum* em macrófagos RAW 264.7 tratados com PLA_2-BnSP-7. Os macrófagos foram tratados com a toxina durante 1 hora, e após este período, a toxina foi retirada (1ª abordagem) e mantida (2ª abordagem). As células ativadas foram infectadas com promastigotas e mantidas em incubadora por um período de 24h para avaliação da proliferação do parasito.

1ª abordagem	Índice de infectividade (proliferação) [a]	Macrófagos infectados (%) [a]	Número de parasitos / macrófagos infectados [a]
Complexo	*L. (L.) infantum*	*L. (L.) infantum*	*L. (L.) infantum*
Controle	139.7 (±6.11)	61.33 (±2.60)	2.27 (±0.007)
BnSP-7	68.33 (±4.25)***	34.00 (±2.30)**	2.02 (±0.17)
2ª abordagem	Índice de infectividade (proliferação) [a]	Macrófagos infectados (%) [a]	Número de parasitos / macrófagos infectados [a]
Complexo	*L. (L.) infantum*	*L. (L.) infantum*	*L. (L.) infantum*
Controle	139.7 (±6.11)	61.33 (±2.60)	2.27 (±0.007)
BnSP-7	94.00 (±4.93)**	37.67 (±2.84)**	2.50 (±0.08)*

[a] Os resultados são expressos como a media e o desvio padrão (± SD) de um experimento realizado em triplicata.

** Redução estatisticamente significativa quando comparado com o controle ($p < 0,001$)

*** Redução estatisticamente significativa quando comparado com o controle ($p < 0,0007$)

* Aumento estatisticamente significativo quando comparado com o controle ($p < 0,05$)

Devido ao efeito citotóxico resultante da ação da PLA_2 em macrófagos, as Figuras 9 e 10 mostram a morfologia de macrófagos RAW 264.7 resultados dos ensaios de invasão (Figura 9) e proliferação (Figura 10), seguindo as duas abordagens de tratamento com a toxina. As imagens mostram que as células mantiveram sua integridade após o tratamento com a toxina e infecção com os parasitos, uma vez que exibem morfologia similar aos controles (macrófagos incubados na ausência de toxina).

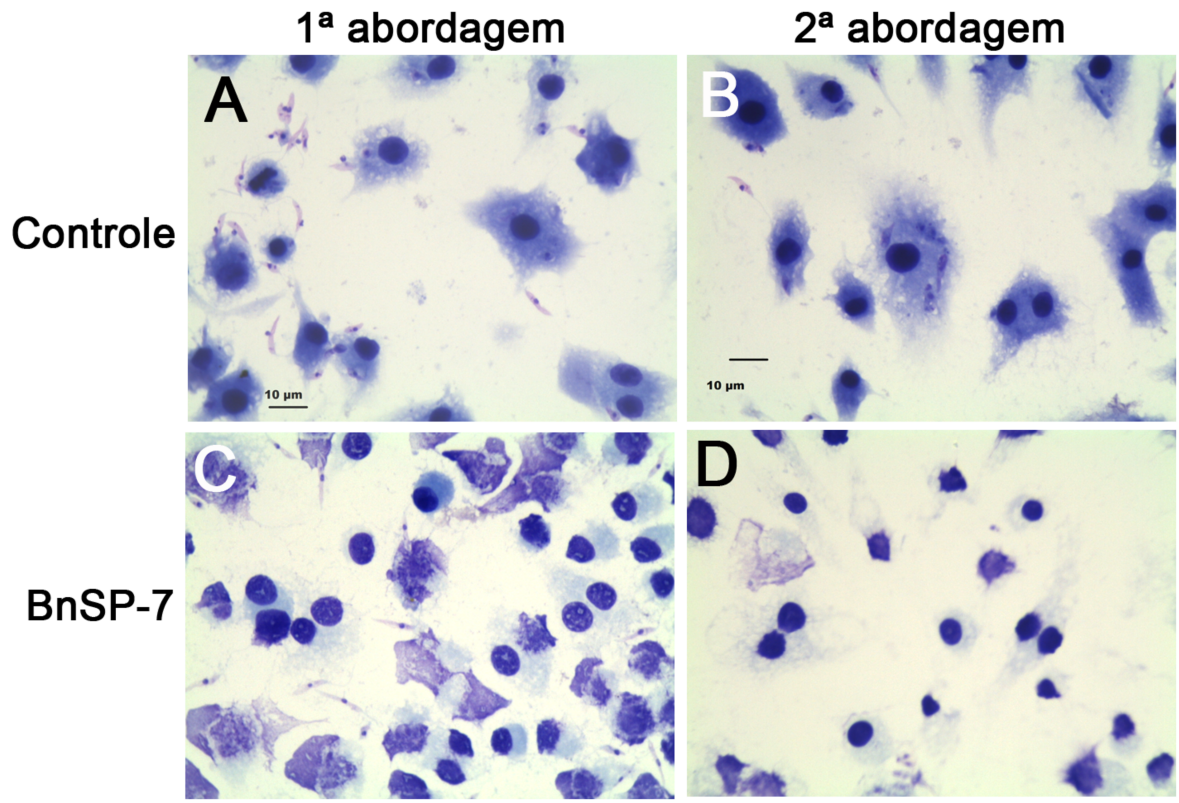


Figura 9. Microscopia óptica de macrófagos RAW 264.7 infectados com promastigotas de *Leishmania (L.) infantum* (ensaio de invasão). Painéis **A** e **B** mostram macrófagos infectados com parasitos previamente incubados na ausência de toxina (controle), seguindo a 1ª e a 2ª abordagem de tratamento, respectivamente. Painéis **C** e **D** mostram macrófagos infectados com parasitos incubados com a PLA_2-BnSP-7, seguindo a 1ª e a 2ª abordagem de tratamento, respectivamente. Barra = 10 µm.

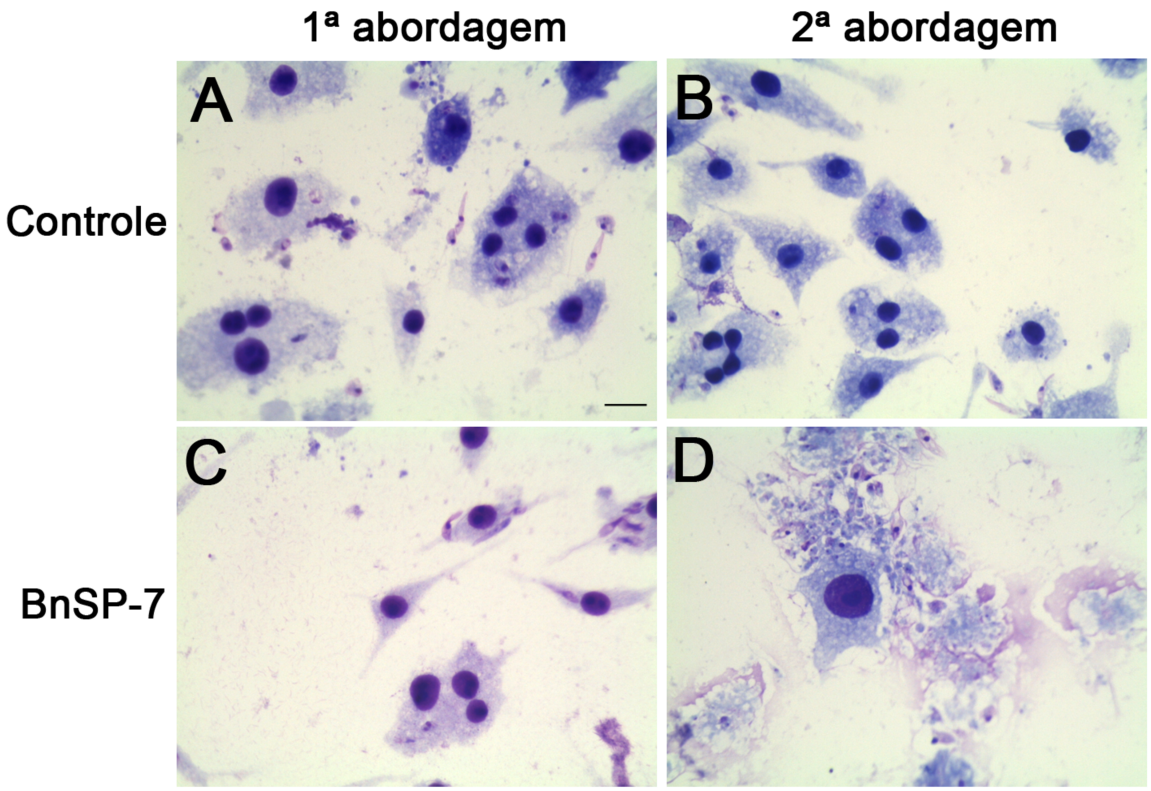


Figura 10. Microscopia óptica de macrófagos RAW 264.7 infectados com promastigotas de *Leishmania (L.) infantum* (ensaio de proliferação). Painéis **A** e **B** mostram macrófagos infectados com parasitos previamente incubados na ausência de toxina (controle), seguindo a 1ª e a 2ª abordagem de tratamento, respectivamente. Painéis **C** e **D** mostram macrófagos infectados com parasitos incubados com a PLA_2-BnSP-7, seguindo a 1ª e a 2ª abordagem de tratamento, respectivamente. Barra = 10 μm.

4. DISCUSSÃO

As peçonhas de serpentes têm sido amplamente utilizadas como fonte para descoberta de novas moléculas com efeito antiparasitário (BORGES et al., 2016; NUNES et al. 2013; TORRES et al., 2010). O efeito de peçonhas ofídicas e suas toxinas purificadas tem sido mostrado por alguns grupos de pesquisa. Entre os efeitos observados estão ação citotóxica, inibição da proliferação do promastigota, bem como interferência no processo de infectividade na célula hospedeira (NUNES et al., 2013; COSTA et al., 2008; TORRES et al., 2010). A ação da PLA_2 da peçonha de serpentes do gênero *Bothrops* na inibição do crescimento de formas promastigotas de *Leishmania* já foi descrito para *Leishmania major, L. (L.) amazonensis, L. (V.) braziliensis,* e *L. chagasi* (COSTA et al., 2008; NUNES et al., 2013; STÁBELI et al., 2006).

Estudos desenvolvidos anteriormente em nosso laboratório mostraram o efeito citotóxico de uma PLA_2 purificada da peçonha de *B. pauloensis* (PLA_2-BnSP-7) em formas promastigota de *L. (L.) amazonensis*, sendo observado um efeito concentração-dependente e, após 72h de incubação com a toxina, o valor IC_{50} foi de 58,7 μg/mL (NUNES et al., 2013). Comparativamente, os resultados apresentados neste trabalho revelaram que PLA_2-BnSP-7 também exibe citotoxicidade concentração-dependente em formas promastigota de *L. (L.) infantum*, sendo que após 72h de incubação com a toxina o valor de IC_{50} foi de 33,52 μg/mL. Desta forma, percebemos que diferentes espécies de *Leishmania* apresentam valores diferentes de IC_{50}, o que indica que a susceptibilidade na presença da toxina pode variar de espécie para espécie. Ainda, Nunes et al. (2013) mostrou que a incubação de macrófagos peritoneais murinos em presença de PLA_2-BnSP-7 por 24h causa citotoxicidade, sendo o valor de IC_{50} de 5,6 μg/mL. Neste trabalho, em macrófagos RAW 264.7, a PLA_2-BnSP-7 também promoveu efeito citotóxico. Entretanto, para esta linhagem celular o valor de IC_{50} foi de 17,56 μg/mL para o período de 24h de incubação com a toxina. Como esperado, um tempo

menor de incubação com a toxina (4h) resultou em um valor de IC_{50} um pouco mais elevado (26,43 μg/mL), indicando que a ação citotóxica da PLA_2 em macrófagos RAW 264.7 é dependente do tempo. Comparativamente, os dados de viabilidade da PLA_2-BnSP-7 em diferentes linhagens de células hospedeiras revelaram que a toxina exerce efeito citotóxico, porém os valores de IC_{50} diferem, indicando que a susceptibilidade na presença da PLA_2 pode também variar para as diferentes linhagens celulares.

A análise dos dados de infectividade (invasão e proliferação) revelou que a PLA_2 BnSP-7 foi capaz de reduzir os índices de infectividade relacionado à invasão e à proliferação de formas promastigota de *L. (L.) infantum*, em 54% e 50%, respectivamente, na 1ª abordagem de tratamento, e 55% e 32%, respectivamente, na 2ª abordagem de tratamento. Esses dados sugerem que a toxina foi efetiva por promover interferência na interação do parasito com a célula hospedeira em ambas abordagens utilizadas. O uso da 1ª abordagem de tratamento tinha por intenção excluir a ação deletéria da toxina sob o parasito. Assim, o efeito da toxina na invasão e proliferação seria decorrente somente da ação da toxina na célula hospedeira pelo período de 1h. Entretanto, os dados revelaram que no ensaio de invasão, a presença (1ª abordagem) ou ausência da toxina (2ª abordagem) durante a interação do parasito com a célula hospedeira não promoveu diferença na porcentagem de inibição da invasão. Por outro lado, nos ensaios de proliferação, as duas abordagens de tratamento resultou em diferenças nas porcentagens de inibição da proliferação, sendo observada uma menor porcentagem de inibição no uso da 2ª abordagem de tratamento, no qual a toxina permaneceu no meio de cultura durante o processo de interação do parasito com a célula hospedeira. A ação dos macrófagos durante o estabelecimento da doença é muito importante uma vez que o macrófago é a principal célula invadida pelo parasito. Assim, os mecanismos de defesa desta célula contra o patógeno em questão, tais como produção de citocinas e compostos metabólicos oxigenados, como o óxido nítrico (NO), entre outros, são determinantes para o

estabelecimento da doença (BALARAMAN et al., 2004; GOMES et al., 2005; TRIPATHI et al., 2007; BOGDAN; ROLLINGHOFF, 1998, 1999).

Durante o processo de infecção por *Leishmania*, os macrófagos estimulam a produção de células T auxiliares de tipo 1 (Th1) e tipo 2 (Th2). As células Th1 induzem a produção de interferon (INF)-γ ou Fator de Necrose Tumoral (TNF)-α, que promovem a estimulação e produção de óxido nítrico-sintase induzida (iNOS) na presença de lipopolissacarídeo (LPS) derivado do parasito. Esta enzima catalisa a produção de NO responsável por atuar nas vias metabólicas em *Leishmania* sp. de forma a destruir o parasito (BALESTIERI et al., 2002; BALARAMAN et al., 2004).

As citocinas são mediadores importantes nas interações celulares em eventos imunológicos e inflamatórios. Estudos anteriores relatam altos níveis de interleucina (IL)-6, TNF-α, IL-1α e IFN-γ no soro de humanos e de camundongos após injeção de altas doses de peçonha de serpentes do gênero *Bothrops* (LOMONTE et al., 1993; BARROS et al., 1998; PETRICEVICH et al., 2000; BARRAVIEIRA et al., 1995). Como descrito anteriormente, a produção dessas citocinas pelo macrófago é de extrema importância para combate do parasito. Um estudo desenvolvido por Bogdan e Rollinghoff (1999) mostrou que macrófagos de humanos e camundongos infectados com *Leishmania donovani* mostraram uma redução na produção de IL-1 e/ou TNF-α, após o estimulo com LPS ou *Staphylococcus aureus*, demonstrando que o parasito pode reduzir a resposta imune resultando na falha da liberação dessas citocinas, o que é relevante para a sua sobrevivência.

Durante a interação de patógenos com a célula hospedeira, moléculas na superfície do patógeno interagem com receptores na superfície da célula hospedeira ativando cascatas intracelulares que induzem eventos benéficos ou para o patógeno ou para o hospedeiro (DESJARDINS; DESCOTEAUX, 1999). A célula, durante a infecção por um patógeno, induz a "explosão respiratória ou oxidativa", que consiste na liberação de espécies reativas de

oxigênio, e secreção de citocinas inflamatórias que contribuem para o combate do patógeno. O parasita *Leishmania* ao infectar macrófagos, ao contrário dos demais patógenos, escapa desta explosão respiratória e da produção de citocinas como IL-1, IL-6, IL-12 e TNF-α (REINER et al., 1994; CARRERA et al., 1996). As formas promastigota de *Leishmania* se aderem à superfície celular por receptores do complemento CR1 e CR3, os quais favorecem a sobrevivência deste parasito, pois estes receptores promovem a fagocitose sem ativação da explosão oxidativa, e inibem a produção de IL-12, uma citocina que estimula a produção de TNF-α e IFN-γ (DESCOTEAUX; TURCO, 2002). Assim, as formas promastigota de *Leishmania* invadem o macrófago de forma silenciosa, impedindo a ativação de macrófagos para a produção de NO e citocinas pró-inflamatórias, como a IL-12 (CARRERA et al., 1996; REINER et al., 1994). Bogdan e Rollinghoff (1999) mostraram que um dos mecanismos de escape do parasita *Leishmania* sp. é a sua indução na produção de citocinas que contrariam o desenvolvimento de uma resposta imune de células T auxiliares de tipo 1 (Th1) como Fator de Transformação do Crescimento (TGF)-β e IL-10, fatores que inibem a proliferação de células T e a ativação dos macrófagos.

A ação de IL-12 é crucial para as respostas inatas e Th1 aos parasitas protozoários, pois estimula a produção de TNF-α e IFN-γ, que são conhecidos por serem as principais citocinas necessárias nos primeiros estágios da resposta inflamatória para a ativação da respiração oxidativa nas células migratórias (DING et al., 1988; LEEUWENBERG et al., 1990). Estudos anteriores mostraram que promastigotas metacíclicos de *L. major*, *L. donovani* e outras espécies de *Leishmania*, assim como os amastigotas de *L. mexicana* ou *L. major*, não induziram a produção de IL-12 após a infecção de macrófagos peritoneais de medula óssea de rato ou células mononucleares de sangue periférico humano (BOGDAN; ROLLINGHOFF, 1999).

Os tratamentos com PLA_2-BnSP-7 utilizados neste trabalho tinha por intenção a ativação

da célula hospedeira. Dessa forma, a toxina, que apresenta efeitos pró-inflamatórios previamente descritos (LOMONTE et al., 1993; BARROS et al., 1998; PETRICEVICH et al., 2000; BARRAVIEIRA et al., 1995), estimularia a produção de citocinas inflamatórias as quais, provavelmente, iriam interferir com o processo de invasão/proliferação do parasito na célula hospedeira.

A análise dos dados de invasão mostrou que a interferência da toxina no processo de invasão, para ambas as abordagens, foi muito semelhante quando comparado com seus respectivos controles. Assim, estes dados podem sugerir que a ação da PLA_2-BnSP-7 no processo de invasão do parasito no macrófago esteja somente associado com seu efeito na célula hospedeira.

No ensaio de infectividade que avaliou a proliferação os resultados mostraram que a toxina, em ambas as abordagens de tratamento, causou reduções significativas no índice de infectividade quando comparado ao controle. Entretanto, esta redução foi menor para a 2ª abordagem de tratamento, indicando que a manutenção da PLA_2 durante o processo de proliferação não foi uma boa estratégia para o controle da infecção. A análise dos dados de porcentagem de macrófagos infectados e média de parasitos/macrófago infectado mostrou que tal redução foi, de fato, decorrente do aumento do número de parasitos/macrófago. Este dado sugere que a permanência da toxina por mais tempo na célula hospedeira (2ª abordagem) promoveu alterações que podem ter contribuído para a proliferação do parasito no ambiente intracelular. Em 2008, um grupo de pesquisa demostrou que uma PLA_2 purificada da peçonha de *Crotalus durissus collilineatus* está associada com a progressão da doença, tanto em modelos de Leishmaniose experimental *in vivo* e *in vitro* (PASSERO, et al., 2008). Os ensaios *in vitro* mostraram que a PLA_2 estimulou o aumento no número de amastigotas de *L. (L.) amazonensis* no interior do macrófago. Entretanto, convém ressaltar que no trabalho de Passero et al. (2008) os macrófagos infectados com parasitos foram mantidos em cultura por

24h e somente após este tempo é que foram colocados em contato com a PLA_2. Assim, a forma de tratamento abordada por este grupo de pesquisa foi bem diferente da apresentada neste trabalho. Ainda, a PLA_2 de *C. collilineatus* em macrófagos infectados com parasitos causou supressão na produção de IL-2 (PASSERO, et al., 2008) uma citocina associada à resposta Th1, que está relacionado à capacidade do hospedeiro em controlar a infecção. De acordo com o grupo, a modulação na produção de IL-2 poderia justificar a progressão da doença devido a ação da PLA_2.

Apesar do efeito da toxina no ensaio de proliferação utilizando a 2ª abordagem de tratamento não ter sido tão eficiente quanto a 1ª abordagem, fica evidente a interferência que a PLA_2 BnSP-7 causou no modelo de infecção *in vitro*. Tais resultados sugerem que, de modo geral, a PLA_2, na concentração utilizada, conferiu a célula hospedeira maior resistência ao parasito, inibindo tanto a invasão quanto a proliferação. Embora não tenhamos os dados de dosagem de citocinas, possivelmente, a interferência da PLA_2 BnSP-7 nos experimentos aqui apresentados esteja relacionado com a promoção de eventos inflamatórios característicos de PLA_2. Conforme descrito por Gutiérrez e Lomonte (1995), fosfolipases miotóxicas como Asp49 e Lys49 já demonstraram provocar eventos inflamatórios em modelos experimentais. Estes eventos inflamatórios estão associados primeiramente com a atividade enzimática e liberação de metabólitos do ácido araquidônico.

A PLA_2-BnSP-7 é uma Lys49 e, portanto, não possui atividade catalítica. Dessa forma, ela não é capaz de produzir ácido araquidônico, como as PLA_2s cataliticamente ativas, o qual será utilizado como substrato na via das cicloxigenases para a produção de prostaglandinas, um mediador pró-inflamatório. No entanto, já foi demonstrado a indução na produção de mediadores inflamatórios lipídicos (prostaglandinas e leucotrienos) induzidos por PLA_2s Lys49 (CHACUR et al., 2004; MOREIRA et al., 2013). Moreira et al. (2013) demonstraram que macrófagos tratados com MT-II, uma PLA_2 Lys49 isolada da peçonha de

Bothrops asper, induziu a produção de prostaglandina e a expressão de cicloxigenase (COX-2), ativando várias vias de sinalização que participam da via de produção das prostaglandinas. As vias pelas quais a PLA_2 Lys49 desencadeia o processo inflamatório não estão totalmente elucidadas. No entanto, sabe-se que o efeito citotóxico da PLA_2 Lys49 de peçonhas ofídicas é atribuído à região C-terminal composta por duas regiões conservadas de resíduos de aminoácidos básicos e hidrofóbicos que podem interagir com fosfolipídios de membrana carregados negativamente e desta forma desestabilizar a membrana celular (DENNIS, 1994; ALOULOU et al., 2012; RODRIGUES et al., 2015; LOMONTE et al. 2003). Durante uma resposta imune e inflamatória, diversos tipos de células produzem citocinas, das quais as principais mediadoras da inflamação são IL-1, TNF-α e TNF-β (DINARELLO, 1996). Conforme mencionado anteriormente, diversos trabalhos já demonstraram a presença de citocinas pró-inflamatórias no soro de humanos que sofreram envenenamento por *Bothrops*, e em modelos experimentais de envenenamento (BARRAVIEIRA et al., 1995; BARROS et al., 1998; CARDOSO, et al., 2001; CLISSA et al., 2001; CARNEIRO et al., 2002; RUCAVADO et al., 2002; CRUZ et al., 2005; CHAVES et al., 2005; FERNANDES et al., 2006; ZULIANI et al., 2005; ZAMUNER et al., 2005; LOMONTE et al., 1993; PETRICEVICH et al., 2000). Essas citocinas são mediadores importantes nas interações celulares em eventos imunológicos e inflamatórios. Ainda, estudos anteriores demonstraram que uma MT-II, uma PLA_2 Lys49 da peçonha de *Bothrops asper* foi capaz de aumentar a concentração de IL-6 no soro de camundongos SWISS (LOMONTE et al., 1993; ZULIANI et al., 2005). Desta forma, acreditamos que a interferência da PLA_2-BnSP-7 no processo de interação de *L. (L.) infantum* com o macrófago pode ser decorrente da liberação de mediadores pró-inflamatórios por estímulo da toxina na célula hospedeira.

Devido aos vários problemas encontrados nos tratamentos atuais disponíveis para a Leishmaniose, como a alta toxicidade das drogas existentes, sobre os rins, fígado, coração,

causando insuficiência renal, alterações cardiológicas e anemia (GONTIJO; DE CARVALHO, 2003; CROFT; COOMBS, 2003; WHO, 2010), a busca por novas moléculas com potencial terapêutico, que atuam de forma a inibir a infeção do parasito *Leishmania* nas células do hospedeiro, é necessária. Neste contexto, o presente trabalho demonstrou a atividade *in vitro* da PLA_2-BnSP-7 extraída da peçonha de *Bothrops pauloensis* na interação de formas promastigota de *L. (L.) infantum* e macrófagos RAW 264.7.

Por fim, convém comentar que os sobrenadantes dos experimentos de invasão/proliferação desenvolvidos neste trabalho foram coletados e armazenados para posterior dosagem de citocinas, uma vez que o tempo para elaboração deste trabalho não permitiu que esta etapa fosse realizada. Desta forma, a discussão apresentada neste trabalho tem por base resultados da literatura, que possam justificar os resultados obtidos neste trabalho, porém a dosagem de citocinas deve ser realizada para comprovação da literatura e adequação dos resultados e discussões deste trabalho. Desta forma, perspectivas futuras deste trabalho incluem a dosagem de citocinas a fim de justificar os resultados já então obtidos.

5. CONCLUSÃO

Nossos resultados demonstraram que a PLA_2-BnSP-7 interferiu positivamente na célula hospedeira reduzindo a invasão e proliferação de formas promastigota de *L. (L.) infantum*, e esta capacidade pode estar atribuída à produção de citocinas pró-inflamatórias que resulta em um ambiente hostil ao desenvolvimento da forma intracelular do parasito, promovendo o controle do processo de infecção do parasito nas células do hospedeiro. Este potencial da PLA_2-BnSP-7 faz com que esta enzima possa ser utilizada como protótipo para o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos.

6. REFERÊNCIAS

ALOULOU, A. et al. Phospholipases: An Overview. **Lipases and Phospholipases**, v. 861, p. 63-85, 2012.

ARNI, R. K.; WARD, R. J. Phospholipase A_2: a structural review. **Toxicon**. v. 34, p. 827-841, 1996.

AZEVEDO, F. V. P. V. et al. Human breast cancer cell death induced by BnSP-6, a Lys-49 PLA_2 homologue from *Bothrops pauloensis* venom. **Int J Biol Macromol**, v. 82, p. 671–77, 2016.

BALARAMAN, S. et al. *Leishmania donovani* induces interferon regulatory factor in murine macrophages: a host defense response. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 30, n. 2, p. 639–47, 2004.

BALESTIERI, F. M. et al. *Leishmania (L.) amazonensis*-induced inhibition of nitric oxide synthesis in host macrophages. **Microbes Infect**, v. 4, n. 1, p. 23–9, 2002.

BARRAVIEIRA, B. et al. Acute-phase reactions, including cytokines, in patients bitten by *Bothrops* and *Crotalus* snakes in Brazil. **J Venom Anim Toxins**, v. 1, n. 1, p. 11-22, 1995.

BARROS, S. F. et al. Local inflammation, lethality and cytokine release in mice injected with *Bothrops atrox* venom. **Mediators Inflamm**, v. 7, p. 339 – 346, 1998.

BOGDAN, C.; ROLLINGHOFF, M. The immune response to *Leishmania*: mechanisms of parasite control and evasion. **Int J Parasitol**. v. 28, n. 1, p. 121-34, 1998.

BOGDAN, C.; ROLLINGHOFF, M. How do protozoan parasites survive inside macrophages? **Parasitol Today**. v. 15, n. 1, p. 22-8, 1999.

BORGES, I. P. et al. Anti-parasitic effect on *Toxoplasma gondii* induced by BnSP-7, a Lys49- phospholipase A_2 homologue from *Bothrops pauloensis* venom. **Toxicon,** v. 119, p.

84-91, 2016.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**. v. 72, p. 248-254, 1976.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana.** 2. ed. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, p. 180, 2007.

BURKE, J. E.; DENNIS, E. A. Phospholipase A_2 structure/function, mechanism, and signaling. **J Lipid Res**, v. 50, p. S237–242, 2009.

CALDERON, L. A. et al. Antitumoral Activity of Snake Venom Proteins: New Trends in Cancer Therapy. **BioMed Research International**. p.1-19, 2014.

CALVETE, J. J. et al. Snake venomics. Strategy and applications. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 42, p. 1405-14, 2007.

CARDOSO, D. F. et al. Role of crotoxin, a phospholipase A2 isolated from Crotalus durissus terrificus snake venom, on inflammatory and immune reactions. **Mediators of Inflammation**, v. 10, p. 125–133, 2001.

CARNEIRO, A. S. et al. Local inflammatory reaction induced by *Bothrops jararaca* venom differs in mice selected for acute inflammatory response. **Toxicon**, v. 40, p. 1571–79, 2002.

CARRERA, L. et al. *Leishmania* promastigotes selectively inhibit interleukin 12 induction in bone marrow-derived macrophages from susceptible and resistant mice, **J Exp Med**, v. 183, n. 2, p. 515–26, 1996.

CHACUR, M. et al. Snake venom phospholipase A_2s (Asp49 and Lys49) induce mechanical allodynia upon peri-sciatic administration: involvement of spinal cord glia, proinflammatory cytokines and nitric oxide. **Pain**, v. 108, p.180–91, 2004.

CHAVES, F. et al. Role of TNF-α, IL-1β and IL-6 in the local tissue damage induced by *Bothrops asper* snake venom: an experimental assessment in mice. **Toxicon**, v. 45, p. 171–78, 2005.

CISCOTTO, P. et al. Antigenic, microbicidal and antiparasitic properties of an L-amino acid oxidase isolated from *Bothrops jararaca* snake venom. **Toxicon**, v. 53, p. 330-41, 2009.

CLISSA, P. B. et al. The effect of jararhagin, a metalloproteinase from *Bothrops jararaca* venom, on pro-infammatory cytokines released by murine peritoneal adherent cells. **Toxicon**, v. 39, p. 1567-73, 2001.

COSTA, T. R. et al. Myotoxic phospholipases A_2 isolated from *Bothrops brazili* snake venom and synthetic peptides derived from their C-terminal region: cytotoxic effect on microorganism and tumor cells. **Peptides**. v. 29, n. 10, p. 1645-1656, 2008.

CROFT, S. L; COOMBS, G. H. Leishmaniasis-current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. **Trends Parasitol**. v. 19, n. 11, p. 502-508, 2003.

CRUZ, A. H. *Crotalus durissus terrificus* Venom Interferes With Morphological, Functional, and Biochemical Changes in Murine Macrophage. **Mediators of Inflammation**, v. 6, p. 349–359, 2005.

DENNIS, E. A. Diversity of group types, regulation, and function of phospholipase A_2. **The Journal of Biological Chemist**, v. 269, p. 13057-13060, 1994.

DE OLIVEIRA, M. R. et al. An evolutionary study of mucosal Leishmaniasis (a 7- to 17-year follow up) due to *Leishmania (Viannia) braziliensis* in Três Braços, Bahia. **Rev Soc Bras Med Trop**. v. 28, n. 4, p. 325-32, 1995.

DESCOTEAUX, A.; TURCO, S. J. Functional aspects of the *Leishmania donovani* lipophosphoglycan during macrophage infection. **Microbes and Infection**, v. 4, p. 975–81, 2002.

DESJARDINS, M.; DESCOTEAUX, A. Phagocytosis of *Leishmania*. Interaction with the

host and intracellular trafficking. **Advances in Cell and Molecular Biology of Membranes and Organelles**, v. 6, p. 297-316, 1999.

DINARELLO, C. A. Cytokines as mediators in the pathogenesis of septic shock. **Curr Top Microbiol Immunol**, v. 16, p. 133-65, 1996.

DING, A. et al. Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages: comparison of activation cytokines and evidence for independent production. **J Immunol**, v. 141, p. 2407–2412, 1988.

FERNANDES, C. M. et al. Inflammatory effects of BaP1 a metalloproteinase isolated from *Bothrops asper* snake venom: Leukocyte recruitment and release of cytokines. **Toxicon**, v. 47, p. 549–559, 2006.

FERNÁNDEZ, J. et al. Isolation of an acidic phospholipase A_2 from the venom of the snake *Bothrops asper* of Costa Rica: Biochemical and toxicological characterization. **Biochimie**, p. 273-83, 2010.

FERREIRA, M. L. et al. Toxic activities of venoms from nine Bothrops species and their correlation with lethality and necrosis. **Toxicon**, v. 30, n. 12, p. 1603–1608, 1992.

FRANCISCHETTI, I. M. B. et al. *Bothrops* sp. Snake venoms: comparison of some biochemical and physicochemical properties and interference in platelet funtions. **Comp Biochem Physiol**, v. 119, p. 21-29, 1998.

FRY, B.G., WUSTER, W. Assembling an arsenal: origin and evolution of the snake venom proteome inferred from phylogenetic analysis of toxin sequences. **Mol Biol Evol**, v. 21, p. 870–883, 2004

GOMES, V. M. et al. Purification and characterization of a novel peptide with antifungal activity from *Bothrops jararaca* venom. **Toxicon**, v. 45, n. 7, p. 817–27, 2005.

GONTIJO, B.; DE CARVALHO M. L. R. American cutaneous Leishmaniasis. **Rev Soc Bras Med Trop**. v. 36, n. 1, p. 71-80, 2003.

GUTIÉRREZ, J. M.; LOMONTE, B. Phospholipase A_2 myotoxins from *Bothrops* snake venoms. **Toxicon**, v. 33, n. 11, p. 1405-24, 1995

HEINRIKSON, R. L. et al. Amino acid sequence of phospholipase A2-alpha from the venom of Crotalus adamanteus. A new classification of phospholipases A_2 based upon structural determinants. **J Biol Chem**, v. 252, n. 14, p. 4913–21, 1977.

HIGUCHI, D. A. Purification and partial characterization of two phospholipase A_2 from *Bothrops leucurus* (white-tailed-jararaca) snake venom. **Biochemie**, v. 89, n. 3, p. 319-28, 2007.

KINI, R. M. Excitement ahead: structure, function and mechanism of snake venom phospholipase A_2 enzymes. **Toxicon**. v. 42, p. 827-840, 2003.

LAINSON R.; SHAW J. J. Evolution, classification and geographical distribution. In: PETERS W; KILLICK-KENDRICK R. (Org.). **The leishmaniases in biology and medicine**. London: Academic Press, 1987. p. 12-120.

LEEUWENBERG, J. F. M. et a. IFN-γ regulates the expression of the adhesion molecule ELAM-1 and IL-6 production by human endothelial cells in vitro. **J Immunol**, v. 145, p. 2110-14, 1990.

LOMONTE, B. et al. Host response to *Bothrops asper* snake venom. Analysis of edema formation, inflammatory cells and cytokine release in a mouse model. **Inflammation**, v. 17, p. 93–105, 1993.

LOMONTE, B. et al. An overview of lysine-49 phospholipase A_2 myotoxins from crotalid snake venoms and their structural determinants of myotoxic action. **Toxicon**, v. 42, p.885–901, 2003.

MAGRO, A. J. et al. Crystal structures of BnSP-7 and BnSP-6, two Lys49-phospholipases A_2: quaternary structure and inhibition mechanism insights. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 311, p. 713–720, 2003.

MASUDA, S. et al. Diverse cellular localizations of secretory phospholipase A_2 enzymes in several human tissues. **Biochemica et Biophysica Acta**, v. 1736, n. 3, p. 200-10, 2005.

MOREIRA, V. et al. A catalytically-inactive snake venom Lys49 phospholipase A_2 homolog induces expression of cyclooxygenase-2 and production of prostaglandins through selected signalling pathways in macrophages. **European Journal of Pharmacology**, v. 708, p.68–79, 2013.

MOSMANN, T. J. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Immunomethods**, v. 65, p. 55-63, 1983.

NEVES, D. P. et al. **Parasitologia humana**. 12. ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 2011.

NUNES, D. C. O. et al. BnSP-7 toxin, a basic phospholipase A_2 from *Bothrops pauloensis* snake venom, interferes with proliferation, ultrastructure and infectivity of *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. **Parasitology** (London. Print), v. 140, n. 7, p. 844-54, 2013.

OLIVEIRA, C. DE F. et al. Insights of local tissue damage and regeneration induced by BnSP-7, a myotoxin isolated from *Bothrops (neuwiedi) pauloensis* snake venom. **Toxicon**, v. 53, n. 5, p. 560-9, 2009

PASSERO, L. F. et al. The effect of phospholipase A_2 from *Crotalus durissus collilineatus* on *Leishmania (Leishmania) amazonensis* infection. **Parasitology Research**, v. 102, p. 1025-33, 2008.

PEICHOTO, M. E. et al. A comparative study of the effects of venoms from five rear-fanged snake species on the growth of *Leishmania major*: Identification of a protein with inhibitory activity against the parasite. **Toxicon**, v. 58, p. 28-34, 2011.

PETRICEVICH, V. L. et al. Increments in serum cytokine and nitric oxide levels in mice injected with *Bothrops asper* and *Bothrops jararaca* snake venoms. **Toxicon**, v. 38, p. 1253–66, 2000.

REINER, S. L. et al. *Leishmania* promastigotes evade interleukin 12 (IL-12) induction by macrophages and stimulate a broad range of cytokines from CD4+ T cells during initiation of infection, **J Exp Med**, v. 179, n. 2, p. 447–56, 1994.

RIBEIRO, L. A. et al. Óbitos por serpentes peçonhentas no Estado de São Paulo: avaliação de 43 casos, 1988/93. **Rev Ass Med Brasil**, v. 44, n. 4, p. 312–318, 1998.

RODRIGUES, V. M. et al. Geographic variations in the composition of myotoxins from *Bothrops neuwiedi* snake venoms: biochemical characterization and biological activity. **Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol**, v. 121, n. 3, p. 215-222, 1998.

RODRIGUES, R. S. et al. Isolation and functional characterization of a new myotoxic acidic phospholipase A(2) from *Bothrops pauloensis* snake venom. Toxicon, v. 50, p. 153-165, 2007.

RODRIGUES, R. S., et al. Structural and functional properties of Bp-LAAO, a new Lamino acid oxidase isolated from *Bothrops pauloensis* snake venom. **Biochimie**, v. 91, p. 490-501, 2009.

RODRIGUES, V. M. et al. *Bothrops pauloensis* Snake Venom Toxins: The Search for New Therapeutic Models. **Curr Top Med Chem**, v. 15, n. 7, p. 670-84, 2015.

RUCAVADO, A. et al. Increments in cytokines and matrix metalloproteinases in skeletal muscle after injection of tissue-damaging toxins from the venom of the snake *Bothrops asper*. **Mediators of Inflammation**, v. 11, p. 121–128, 2002.

SANTOS-FILHO, N. A. et al. A new acidic myotoxic, anti-platelet and prostaglandin I2 inductor phospholipase A_2 isolated from *Bothrops moojeni* snake venom. **Toxicon**, v. 52, p. 908-17, 2008.

SCHALOSKE, R. H.; DENNIS, E. A. The phospholipase A_2 superfamily and its group numbering system. **Biochim Biophys Acta**, v. 1761, n. 11, p. 1246-59, 2006.

SOARES, A. M. et al. Structural and functional characterization of BnSP-7, a Lys49

myotoxic phospholipase A_2 homologue from *Bothrops neuwiedi pauloensis* venom. **Arch Biochem Biophys**, v. 378, n. 2, p. 201-209, 2000.

SOARES A. M. et al. Phospholipases A_2 myotoxins from *Bothrops* snake venoms: structure-function relationship. **Current Organic Chemistry**, v. 8, n. 17, p. 1677-90, 2004.

STÁBELI, R. G. et al. *Bothrops moojeni* myotoxin-II, a Lys49-phospholipase A_2 homologue: an example of function versatility of snake venom proteins. **Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol**, v. 142, n. 3-4, p. 371–81, 2006.

TEMPONE, A. G. et al. *Bothrops moojeni* venom kills *Leishmania* spp. with hydrogen peroxide generated by its L-amino acid oxidase. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 280, n. 3, p. 620-24, 2001.

TEMPONE, A. G. et al. Amphibian secretions for drug discovery studies: a search for new antiparasitic and antifungal compounds. **Letters in Drug Design & Discovery**, v. 4, p. 67-73, 2007.

TORRES, A. F. C. et al. Antibacterial and antiparasitic effects of *Bothrops marajoensis* venom and its fractions: phospholipase A_2 and L-amino acid oxidase. **Toxicon**, v. 55, p. 795-804, 2010.

TRIPATHI, P. et al. Immune response to *Leishmania*: paradox rather than paradigm. **FEMS Immunol Med Microbiol**, v. 51, n. 2, p. 229–42, 2007.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Control of the leishmaniasis: Report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniases. Geneva, **WHO technical report series**; n. 949, p. 186, 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Control of the leishmaniasis: Report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniases. Geneva, **WHO technical report series**; n. 949, p. 186, 2015.

ZAMUNER, S. R. et al. Inflammation induced by *Bothrops asper* venom: release of proinflammatory cytokines and eicosanoids, and role of adhesion molecules in leukocyte infiltration. **Toxicon**, v. 46, p. 806–813, 2005.

ZULIANI, J. P. et al. Inflammatory events induced by Lys-49 and Asp-49 phospholipases A_2 isolated from *Bothrops asper* snake venom: role of catalytic activity. **Toxicon**, v. 45, p. 335–346, 2005.