



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

Rastreamento em células *in vitro* de uma fosfolipase A₂ da peçonha de *Bothrops alternatus* por meio de pontos quânticos de tamanhos mágicos

Aluno: Edigar Henrique Vaz Dias

Orientador: Prof^ª. Dr^ª. Anielle Christine Almeida Silva

Co-Orientador: Prof^ª. Dr^ª. Carla Cristine Neves Mamede

UBERLÂNDIA - MG
2019



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

Rastreamento em células *in vitro* de uma fosfolipase A₂ da peçonha de *Bothrops alternatus* por meio de pontos quânticos de tamanhos mágicos

Aluno: Edigar Henrique Vaz Dias

Orientador: Prof^a. Dr^a. Anielle Christine Almeida Silva

Co-Orientador: Prof^a. Dr^a. Carla Cristine Neves Mamede

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

UBERLÂNDIA – MG
2019

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

D541r
2019 Dias, Edigar Henrique Vaz, 1990
 Rastreamento em células in vitro de uma fosfolipase A2 da peçonha
 de *Bothrops alternatus* por meio de pontos quânticos de tamanhos
 mágicos [recurso eletrônico] / Edigar Henrique Vaz Dias. - 2019.

 Orientadora: Anielle Christine Almeida Silva.
 Coorientadora: Carla Cristine Neves Mamede.
 Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa
 de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica.
 Disponível em: <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.te.2019.1234>
 Inclui bibliografia.
 Inclui ilustrações.

 1. Bioquímica. 2. Fosfolipases. 3. Dengue. 4. Agentes antivirais. I.
 Silva, Anielle Christine Almeida, 1989, (Orient.). II. Mamede, Carla
 Cristine Neves, 1986, (Coorient.). III. Universidade Federal de
 Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica. IV.
 Título.

CDU: 577.1



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica
Av. Pará 1720, Bloco 2E, Sala 244 - Bairro Umuarama, Uberlândia-MG, CEP 38400-902
Telefone: +55 (34) 3225-8438 - www.ppggb.ibtec.ufu.br - ppggb@ufu.br



ATA DE REUNIÃO

Ata da defesa de TESE DE DOUTORADO junto ao Programa de Pós-graduação em Genética e Bioquímica do Instituto de Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia.

Defesa: Tese de Doutorado, nº01/2019- PPGGB

Local: Uberlândia/MG

Data: 29/03/2019

Hora de início: 14:00h

Discente: Edigar Henrique Vaz Dias

Matrícula: 11523GBI007

Título do Trabalho: Rastreamento *in vitro* de uma fosfolipase A₂ da peçonha de *Bothrops alternatus* conjugada com pontos quânticos de tamanhos mágicos.

Área de concentração: Bioquímica

Linha de pesquisa: Estudo e caracterização de proteases de peçonhas de serpentes brasileiras.

Projeto de Pesquisa de vinculação: Estudo da atividade antiviral da peçonha de *Bothrops alternatus* contra os vírus da dengue, hepatite c e sincicial respiratório.

Aos vinte e nove dias do mês de março de dois mil e dezenove, às 14:00 horas no Anfiteatro 4K, Campus Umuarama da Universidade Federal de Uberlândia, reuniu-se a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Genética e Bioquímica, assim composta: Prof. Dr. Norival Alves Santos Filho, Prof^ª. Dr^ª. Fabiana de Almeida Araújo Santos, Prof^ª. Dr^ª. Veridiana de Melo Rodrigues Ávila, Prof. Dr. Jonny Yokosawa e Prof^ª. Dr^ª. Anielle Christine Almeida Silva, orientador (a) do (a) candidato (a) e demais convidados presentes conforme lista de presença. Iniciando os trabalhos o (a) presidente da mesa, a Prof^ª. Dr^ª. Anielle Christine Almeida Silva, apresentou a Comissão Examinadora e o (a) candidato (a), agradeceu a presença do público, e concedeu o (à) Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação do (a) Discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa de Pós-graduação em Genética e Bioquímica. A seguir o (a) senhor (a) presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos examinadores, que passaram a arguir o (a) candidato (a). Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu os conceitos finais. Em face do resultado obtido, a Banca Examinadora considerou o (a) candidato (a): APROVADO (A). Esta defesa de Tese de Doutorado é parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor. O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU. Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos às 18 horas e 30 minutos. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pela Banca Examinadora.



Documento assinado eletronicamente por **Jonny Yokosawa, Professor(a) do Magistério Superior**, em 29/03/2019, às 19:10, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).

Documento assinado eletronicamente por **Veridiana de Melo Rodrigues Avila, Professor(a) do**



Magistério Superior, em 29/03/2019, às 19:12, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Anielle Christine Almeida Silva, Usuário Externo**, em 29/03/2019, às 19:13, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Fabiana de Almeida Araújo Santos, Usuário Externo**, em 29/03/2019, às 19:14, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Norival Alves Santos Filho, Usuário Externo**, em 29/03/2019, às 19:17, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1120103** e o código CRC **ECB3A03F**.

*Cada um de nós compõe a sua história
Cada ser em si
Carrega o dom de ser capaz
E ser feliz*

(Almir Sater e Renato Teixeira)

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus por todas as oportunidades em minha vida, bem como pela força e determinação para terminar mais uma etapa pessoal e profissional.

À Universidade Federal de Uberlândia, ao Programa de Pós Graduação em Genética e Bioquímica, por oferecerem condições para a realização deste trabalho.

Aos membros da Banca Examinadora, Dr. Norival Alves Santos Filho, Dr^a. Fabiana de Almeida Araújo Santos, Dr. Fábio de Oliveira e Dr. Jonny Yokosawa, pela disponibilidade em participar na avaliação deste trabalho.

Aos meus pais, Divino e Keilah, meu irmão, Alencar, e demais familiares, pela confiança em mim depositada, pelo apoio e incentivo em todas as minhas decisões ao longo da vida e pela força que me deram para conseguir chegar até esse momento.

A minha esposa Wanessa Nayara Resende Rocha, pelo apoio em todas as minhas escolhas e pela compreensão, dedicação, companheirismo e paciência desde o mestrado até o momento.

À minha orientadora professora Dr^a. Anielle Christine Almeida Silva, pelo acolhimento, auxílio e ensinamentos fundamentais para o desenvolvimento desta tese de doutorado.

À minha co-orientadora professora Dr^a Carla Cristine Neves Mamede, pela contribuição e conhecimentos a mim transferidos.

Ao professor Dr. Fábio de Oliveira, por me acolher no Laboratório de Biologia Celular e Molecular (LabMoc), pela dedicação, confiança, motivação e ensinamentos a mim transferidos durante todos esses anos.

Aos integrantes do LabMoc, Bruna, Déborah e Mariana, pela amizade, colaboração e convivência, fatores que foram essenciais para o desenrolar deste trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior

(CAPES) e ao Ministério de Ciências e Tecnologia (MCT), pelo suporte financeiro, sem o qual seria impossível o desenvolvimento deste trabalho.

À Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), pela aquisição de espectros FT-IR utilizando um espectrofotômetro Shimadzu Fourier Transform (Vertex 70, Bruker Optik), coordenado pelo Prof. Dr. Carlos José Soares.

Ao Instituto de Química da Universidade Estadual Paulista (UNESP)-Campus Araraquara - São Paulo, pela realização dos testes de dicroísmo circular.

Ao Laboratório de Imunoparasitologia da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), pela aquisição de imagens de microscopia de fluorescência utilizando o microscópio de fluorescência (EVOS fl-AMG, Seattle, EUA).

Ao Laboratório de Virologia da Universidade Federal de Uberlândia, por ceder as alíquotas do vírus da dengue e pelo suporte nos testes antivirais.

Ao Laboratório de Novos Materiais Isolantes e Semicondutores (LNMIS), por ceder os pontos quânticos de tamanhos mágicos.

Muito Obrigado
Edigar Henrique Vaz Dias

Sumário

APRESENTAÇÃO	1
1. INTRODUÇÃO	2
1.1. Serpentes peçonhentas e odifismo no Brasil.....	2
1.2. Peçonhas de serpentes e importância médico-científica.....	3
1.3. Fosfolipases A ₂ da peçonha de serpentes	6
1.3.1. BaltPLA ₂	10
1.4. Pontos quânticos	10
1.4.1. Pontos quânticos de tamanhos mágicos	13
2. OBJETIVOS	16
2.1. Objetivo geral	16
2.2. Objetivos específicos	16
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	17
3.1. Isolamento da BaltPLA ₂	17
3.2. Síntese e caracterização física dos MSPQs de CdSe/CdS.....	17
3.3. Ensaios de bioconjugação dos MSPQs de CdSe/CdS e a BaltPLA ₂	18
3.3.1. Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR).....	18
3.3.2. Cromatografia de fase reversa	18
3.3.3. Espectroscopia de Dicroísmo Circular	19
3.4. Ensaios biológicos com o bioconjugado ou com a BaltPLA ₂ isolada.....	19
3.4.1. Atividade fosfolipásica	19
3.4.2. Cultura de mioblastos	20
3.4.3. Rastreamento da BaltPLA ₂ etiquetada com os MSPQs de CdSe/CdS	20
3.4.4. Obtenção de soro anti-BaltPLA ₂ em camundongos.....	20
3.4.5. Imunofluorescência indireta para detecção da BaltPLA ₂	21
3.5. Atividade antiviral da BaltPLA ₂	22
3.5.1. Cultura de células Vero e vírus	22
3.5.2. Citotoxicidade da BaltPLA ₂ em células Vero.....	22
3.5.3. Ensaio virucida.....	23
3.5.4. Ensaio de atividade antiviral por pré-tratamento	24
3.5.5. Ensaio de atividade antiviral por pós-tratamento	24

3.5.6. Ensaio de adsorção.....	24
3.5.7. Ensaio de internalização	25
3.5.8. Imunofluorescência indireta para o DENV2	25
4. RESULTADOS.....	26
4.1. Caracterização física dos MSPQs de CdSe/CdS.....	26
4.2. Bioconjugação dos MSPQs de CdSe/CdS com a BaltPLA ₂	27
4.3. Cromatografia de fase reversa	29
4.4. Espectroscopia de dicroísmo circular.....	30
4.5. Atividade fosfolipásica	30
4.6. Rastreamento do bioconjugado MSPQs-BaltPLA ₂	31
4.7. Localização da BaltPLA ₂ em mioblastos por imunofluorescência indireta.....	33
4.8. Ensaio antivirais.....	33
5. DISCUSSÃO	38
7. REFERÊNCIAS	51
ANEXOS.....	75

Resumo

As fosfolipases A_2 representam uma classe de enzimas com importante aplicação na medicina. Entretanto, o rastreamento direto em células tem sido difícil devido à ausência de um marcador estável, efetivo e específico para essas enzimas. Os pontos quânticos de tamanhos mágicos (MSPQs) são nanocristais de tamanho extremamente pequeno e com propriedades físicas únicas. Além disso, são excelentes marcadores luminescentes biocompatíveis e podem ser conjugados com várias biomoléculas. Neste trabalho, nós etiquetamos a BaltPLA₂, uma fosfolipase A_2 isolada da peçonha de *Bothrops alternatus*, com MSPQs de seleneto de cádmio/sulfeto de cádmio (CdSe/CdS). A bioconjugação foi confirmada usando espectros de infravermelho e microscopia de fluorescência, os quais demonstraram que os CdSe/CdS MSQDs interagem com a BaltPLA₂ sem interferir em sua atividade catalítica. Essa sonda permitiu o rastreamento da BaltPLA₂ desde sua entrada através da membrana plasmática até sua incorporação no núcleo dos mioblastos. Estudos complementares foram realizados a fim de avaliar a atividade antiviral da BatPLA₂ contra o vírus da dengue. Nossos testes mostraram a diminuição de aproximadamente 72% 50%, 56% da citotoxicidade causada pela infecção pelo DENV nos ensaios virucida, pós-tratamento e adsorção, respectivamente. Assim, os resultados demonstraram a atividade antiviral da BaltPLA₂ e que esta proteína pode ser uma importante ferramenta para o desenvolvimento de alternativas terapêuticas no futuro.

Palavras-chave: fosfolipase A_2 ; pontos quânticos de tamanhos mágicos, antiviral, dengue.

Abstract

Phospholipases A₂ represent a family of enzymes with important application in medicine. However, direct tracking in cells has been difficult due to the absence of a stable, effective and specific marker for these enzymes. Magic-sized quantum dots (MSQDs) are nanocrystals of extremely small size and with unique physical properties. In addition, they are excellent biocompatible luminescent markers and can be conjugated to various biomolecules. In this work, we labelled BaltPLA₂, a PLA₂ isolated from *Bothrops alternatus* snake venom, with Cadmium selenide (CdSe)/cadmium sulphate (CdS) MSQDs. Bioconjugation was confirmed using infrared spectra and fluorescence microscopy, which demonstrated that the CdSe/CdS MSQDs interact with BaltPLA₂ without interfering with its catalytic activity. This probe allowed the tracking of BaltPLA₂ since its entry through the plasma membrane to its incorporation into the myoblast nucleus. Complementary studies were carried out to evaluate the antiviral activity of BatPLA₂ against the dengue virus. Our tests showed a decrease of approximately 72% 50%, 56% of the cytotoxicity caused by DENV2 infection in the virucidal, post-treatment and adsorption assays, respectively. Thus, the results demonstrated the antiviral activity of BaltPLA₂ and that this protein could be an important tool for the development of therapeutic alternatives in the future.

KEYWORDS: phospholipase A₂; magic-sized quantum dot; antiviral, dengue.

APRESENTAÇÃO

Esta tese de doutorado foi elaborada de acordo com as normas estabelecidas pelo Programa de Pós Graduação em Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia.

De forma concomitante ao desenvolvimento da tese, finalizamos os testes de caracterização da BaltPLA₂, que deram origem ao artigo intitulado “BaltPLA₂: A new phospholipase A₂ from *Bothrops alternatus* snake venom with antiplatelet aggregation activity” publicado na revista “Protein & Peptide Letters” (Fator de impacto = 1.039) (Anexo I), o qual pode ser localizado pelo doi 10.2174/0929866525666181004101622.

O presente trabalho teve por objetivo descrever a bioconjugação e o rastreamento *in vitro* da BaltPLA₂ utilizando pontos quânticos de tamanhos mágicos de CdSe/CdS. Como resultado, obtivemos a publicação do artigo intitulado “In vitro tracking of phospholipase A₂ from snake venom conjugated with magic-sized quantum dots” na revista “International Journal of Biological Macromolecules” (Fator de impacto = 3.671) (Anexo II), o qual pode ser localizado pelo doi 10.1016/j.ijbiomac.2018.10.185. A fim de complementar os estudos com a BaltPLA₂, realizamos ensaios de interação da mesma com o DNA de mioblastos e testes antivirais contra o vírus da dengue sorotipo 2, os quais serão submetidos posteriormente a outra revista como requisito para homologação de tese no Programa de Pós Graduação em Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia.

Nosso trabalho foi realizado no Laboratório de Biologia Molecular e Celular da Universidade Federal de Uberlândia em parceria com o Laboratórios de Imunoparasitologia "Dr. Mario Endsfieldz Camargo", Laboratório de Virologia, Laboratório de Novos Materiais Isolantes e Semicondutores (LNMIS) e com Centro de Pesquisa em Biomecânica, Biomateriais e Biologia Celular (CPBio), todos desta mesma universidade. Ainda, tivemos o apoio do Instituto de Química da Universidade Estadual Paulista (UNESP) - Campus Araraquara - São Paulo.

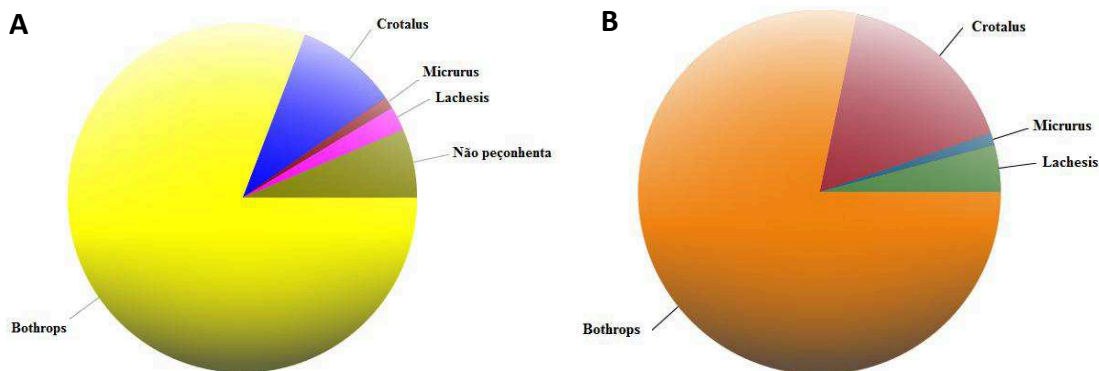
1. INTRODUÇÃO

1.1. Serpentes peçonhentas e odifismo no Brasil

As serpentes estão entre os animais de relevância médico-científica (FATIMA & FATAH, 2014; MUKHERJEE et al., 2011). Desde o ano de 2009 a Organização Mundial da Saúde (OMS) integrou os acidentes ofídicos à lista de doenças tropicais negligenciadas (WARRELL, 2010), visto que o envenenamento por serpentes peçonhentas é a causa de expressiva morbidade em regiões tropicais e subtropicais (CHIPPAUX, 2017; FEITOSA et al., 2015; KASTURIRATNE et al., 2008; GUTIÉRREZ et al., 2006).

De acordo com o Ministério da Saúde, a maioria dos casos de acidentes com serpentes peçonhentas no Brasil é provocada por animais da família Viperidae, destacando-se quatro gêneros: *Bothrops* (jararaca), *Crotalus* (cascavel), *Lachesis* (surucucu) e *Micrurus* (coral) (BRASIL, 2018). Conforme o Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN) do Ministério da Saúde, em 2016 no Brasil, houve 23.162 casos de acidentes ofídicos. Destes, 80,77% são causados pelas serpentes peçonhentas do gênero *Bothrops*, seguido por *Crotalus* (9,45%), *Lachesis* (2,24%) e *Micrurus* (1,04%) (Figura 1A). Estatisticamente, ainda em 2016, a morte decorrente dos agravos por acidentes botrópicos corresponde a mais de 78% comparada aquela associada aos outros gêneros. Esses dados refletem a grande importância do envenenamento ofídico por espécies do gênero *Bothrops* no país (Figura 1B).

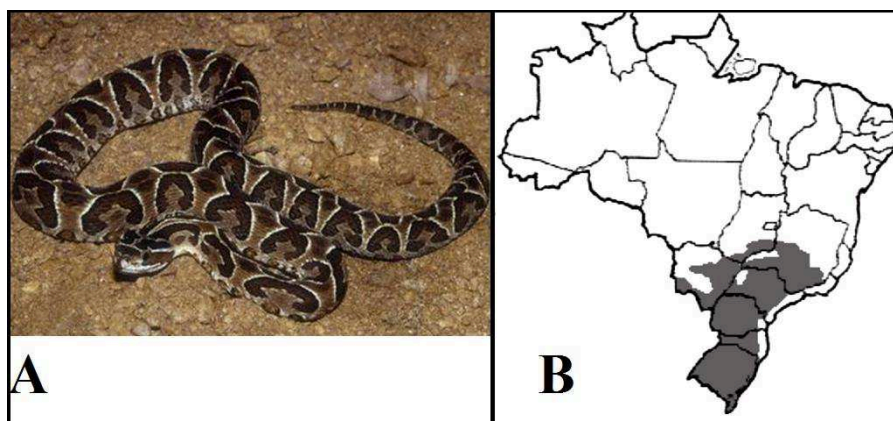
Figura 1. Casos de ofidismo no Brasil (A) e óbito pelos agravos notificados (B) no ano de 2016.



Fonte: BRASIL, 2018.

As serpentes da espécie *Bothrops alternatus* (Figura 2A) integram a família Viperidae e são amplamente distribuídas em algumas áreas da América do Sul, incluindo o norte da Argentina, Paraguai, Uruguai (CACCIALI et al., 2016; COLA; CHIARAVIGLIO, 2011; CAMPBELL & LAMAR, 2004). No território brasileiro, estes animais vivem nas regiões sul, sudeste e em parte da região central (Figura 2B) (MELGAREJO, 2003). Preferencialmente, essas serpentes habitam áreas úmidas nas imediações de rios e córregos, além de serem encontradas em locais de lavouras (MESQUITA & BRITES, 2003).

Figura 2. (A) Exemplar da espécie *Bothrops alternatus*. Foto: Márcio Borges-Martins. (B) Distribuição geográfica da espécie *Bothrops alternatus* no Brasil.



Fonte: MELGAREJO et al., 2003

1.2. Peçonhas de serpentes e importância médico-científica

As serpentes produzem peçonha por meio de glândulas especializadas com a finalidade de paralisar e pré-digerir suas presas (SILVA, 2011). Fatores como a idade do animal, sexo, dieta, espécie e condições ambientais interferem de forma decisiva na composição quantitativa e qualitativa das peçonhas ofídicas (VÉLEZ et al., 2017; ZELANIS et al., 2012; MENEZES et al., 2006; CHIPPAUX et al., 1991). Constitutivamente, essas peçonhas são uma complexa mistura de componentes orgânicos e inorgânicos tais como proteínas, lipídeos, carboidratos, cátions metálicos, nucleosídeos, aminoácidos e aminas biogênicas, dentre outros

(MENALDO et al., 2013; STÚBAL et al., 2013; CUNHA & MARTINS et al., 2012; IZIDORO et al., 2006; CHIPPAUX et al., 1991; BIEBER, 1979).

Nas últimas décadas, os avanços dos estudos de transcriptoma e das ferramentas de proteômica facilitaram o estudo da composição proteica das peçonhas de serpentes. Grande parte das proteínas encontradas pertence às classes das metaloproteases (svMP), serino proteases (svSP), L-aminoácido oxidases (svLAO) e fosfolipases A₂ (svPLA₂) (TASOULIS & ISBISTER, 2017), as quais apresentam variados efeitos fisiopatológicos após o envenenamento ofídico (SANHAJARIYA et al., 2018; HERRERA et al., 2013; GUTIÉRREZ et al., 2009).

Os efeitos fisiopatológicos motivados, principalmente, por essas classes de toxinas são divididos em locais e sistêmicos, alterando a homeostasia tecidual e o bom funcionamento dos órgãos. No local da picada, há a presença de necrose, edema, dor, quadros hemorrágicos e de infiltrados inflamatórios (DELAFONTAINE et al., 2017; GUTIÉRREZ et al., 2016; MAMEDE et al., 2016; KURUPPU et al., 2007). A distribuição sistêmica das toxinas é facilitada pelo sistema vascular e linfático, ocasionando alterações cardíacas, cerebrais, pulmonares e até a morte do indivíduo (PANIAGUA et al., 2015; HERRERA et al., 2013).

As implicações hemorrágicas e inflamatórias do envenenamento são resultantes, especialmente, da atuação de duas classes de toxinas, as svPLA₂ e as svMP. A ação das svPLA₂ proporciona a produção de mediadores inflamatórios que atuam na formação de edema e alterações de permeabilidade vascular (CASAIS-E-SILVA et al., 2016). Os danos nos vasos sanguíneos também são gerados pelas svMP, induzindo o extravasamento de líquido e aumento de permeabilidade, o que resulta na formação de edema e episódios hemorrágicos (BALDO et al., 2010; FERNANDES et al., 2006; TEIXEIRA et al., 2005). A lesão vascular e o infiltrado inflamatório gerado pela atividade conjunta dessas duas toxinas contribuem para o surgimento de necrose tecidual (BUSTILLO et al., 2015; GUTIÉRREZ et al., 2009).

Apesar de atuarem em menor proporção, as svSP também são capazes de influenciar na resposta inflamatória local, por meio da ativação de componentes do sistema complemento (MENALDO et al., 2013), e influenciar nos quadros hemorrágicos, degradando componentes da membrana basal do endotélio (GUTIÉRREZ et al., 2005), além de exercerem ações fibrinogolíticas, ativação

de protrombina e fator X da coagulação, inibição da agregação plaquetária e apoptose (SANCHEZ et al., 2017; KINI & KOH, 2016; BERGER et al., 2008; DÍAZ et al., 2005).

Ainda que as svPLA₂, as svMP e as svSP contribuam para os quadros hemorrágicos do acidente ofídico, as svLAAO também são importantes clinicamente, um vez que podem causar citotoxicidade celular, além de apoptose das células endoteliais e consequente extravasamento de sangue para o interstício (STÁBELI et al., 2007; ARAKI et al., 1993).

Apesar de todos os efeitos fisiopatológicos decorrentes do acidente ofídico, as peçonhas de serpentes contêm inúmeras toxinas com atividades de interesse para a medicina e algumas já se tornaram medicamentos (AKEF, 2017). Em 1970, um estudo realizado no Brasil demonstrou a atividade anti-hipertensiva de um peptídeo ativo extraído da peçonha de *Bothrops jararaca* que proporcionou o desenvolvimento do medicamento Captopril® (CUSHMAN et al., 1977; FERREIRA et al., 1970). Outros medicamentos baseados em toxinas ofídicas também foram desenvolvidos e aprovados pelo *Food and Drug Administration (FDA)*, alguns deles estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1. Exemplos de medicamentos desenvolvidos a base de toxinas da peçonha de serpentes.

Nome genérico	Espécie de origem	Mecanismo de ação	Referência
Enalapril	<i>Bothrops jararaca</i>	Inibidor da enzima conversora de angiotensina	UDUPA et al., 1997
Reptilase	<i>Bothrops atrox</i> ou <i>Bothrops moojeni</i>	Provoca a quebra de cadeias do fibrinogênio	STOCKER et al., 1976
Hemocoagulase	<i>Bothrops atrox/ Bothrops jararaca</i>	Ocasiona a quebra das cadeias do fibrinogênio e ativação do fator X e/ou da protrombina	QIU et al., 2017

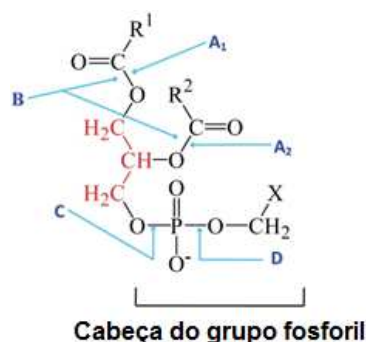
Ao longo dos anos, os estudos do potencial terapêutico das toxinas de serpentes têm se intensificado. Várias propriedades/aplicações biológicas dessas moléculas foram descritas, incluindo antibacterianas (FERREIRA et al., 2011),

antiparasitárias (ADADE et al., 2014), anticoagulantes (QUEIROZ et al., 2014), analgésicas (ZHAO et al., 2017), antitumorais (URRA & ARAYA-MATURANA, 2017), antiagregação plaquetária (DIAS et al., 2018; MATIAS et al., 2017) e antivirais (MULLER et al., 2014).

1.3. Fosfolipases A₂ da peçonha de serpentes

As fosfolipases são uma complexa família de proteínas encontradas em diversos organismos como bactérias, vertebrados e plantas (HUANG et al., 2015; CANONNE et al., 2011; ISTIVAN & COLOE, 2006). São divididas em A₁, A₂, B, C e D de acordo com o sítio de clivagem na molécula de glicerofosfolípdeo. Aquelas que clivam na posição sn-1 e sn-2 são denominadas como fosfolipases A₁ e A₂, respectivamente, enquanto as fosfolipases B atuam em ambas as posições. As fosfolipases C clivam a ligação fosfodiéster na região proximal ao glicerol e as fosfolipases D na ligação fosfodiéster próxima ao grupo X (DJORDJEVIC, 2010) (Figura 3).

Figura 3. Sítios de clivagem dos glicerofosfolípdeos pelas fosfolipases. Em vermelho está representada a cadeia de glicerol dos fosfolípdeos. As setas indicam os sítios de atuação dessas proteínas.



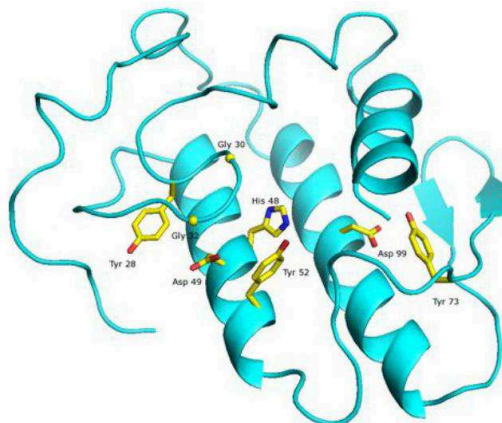
Fonte: Adaptado de DJORDJEVIC (2010).

As fosfolipases A₂ são distribuídas em seis grupos principais: fosfolipases A₂ citosólicas (cPLA₂s), fosfolipases A₂ independentes de cálcio (iPLA₂), fosfolipases associadas à lipoproteínas (Lp-PLA₂s), fosfolipases adiposas (AdPLA₂s), fosfolipases lisossomais (LPLA₂s) e as fosfolipases A₂ secretadas (sPLA₂), sendo este último grupo o mais abundante (GLUKHOVA et al., 2015; LESLIE et al., 2015; MURAKAMI et al., 2015; RAMANADHAM et al., 2015; PANG

et al., 2012; CARLQUIST et al., 2007). As sPLA₂ dividem-se em 10 grupos e (I, II, III, V, IX, X, XI, XII, XIII, XIV) e subgrupos (DENNIS et al., 2011; SCHALOSKE & DENNIS, 2006). Aquelas pertencentes às peçonhas de serpentes da família Viperidae se enquadram no subgrupo IIA (SCHALOSKE & DENNIS, 2006). São enzimas com baixo peso molecular (14-18 kDa) e compostas de sete pontes dissulfeto em suas composições, as quais conferem estabilidade à estrutura secundária e resistência a ação de proteases (OJEDA et al., 2018; GHAZARYAN et al., 2015).

As sPLA₂ das peçonhas de serpentes (svPLA₂) apresentam 120-125 resíduos de aminoácidos com regiões altamente conservadas entre as espécies (OLIVEIRA et al., 2018; ARIAS et al., 2017; TIMILSINA et al., 2013; VIJA et al., 2009; BERGH et al., 1989). Uma delas contém o aspartato na posição 49 (Asp-49) onde se encontra o sítio catalítico dependente de íons Ca²⁺, o qual é essencial para a ativação enzimática (GALBIATTI et al., 2012; DENNIS et al., 2011). O sítio de ligação dessas enzimas ao Ca²⁺ é constituído pelo grupo β-carboxil do resíduo Asp-49 juntamente com o grupo carbonil dos resíduos de tirosina e glicina (DENNIS et al., 2011; FLEER et al., 1981). Após a ligação desses íons, ocorrem mudanças conformacionais e ativação enzimática, essenciais para a hidrólise dos fosfolipídeos, primariamente a fosfatidilcolina (AKUBUGWO et al., 2016; BALSINDE et al., 2002). Apesar do Asp-49 ser o principal componente característico das svPLA₂ enzimaticamente ativas, outros resíduos de aminoácidos são característicos do *loop* de ligação ao cálcio (Ca²⁺-*binding loop*) e são importantes para suas atividades enzimáticas, como a tirosina nas posições 28 (Tyr-28) e 52 (Tyr-52), além de glicina nas posições 30 (Gly-30) e 32 (Gly-32). Enquanto as posições 48 e 99 contêm os resíduos de histidina e aspartato, respectivamente (Figura 4) (PEREIRA et al., 1998; BERGH et al., 1989).

Figura 4. Estrutura básica das svPLA₂ asp49 de serpentes do gênero *Bothrops*, indicando os resíduos de aminoácidos (Asp-49, Tyr-28, Tyr-52, Gly-30, Gly-32, His-48 e Asp-99) conservados no *loop* de ligação do Ca²⁺.



Fonte: MARCUSSI et al., 2007.

Por outro lado, a substituição do Asp-49 por uma lisina (Lys-49) confere ausência de atividade enzimática ao subgrupo das svPLA₂ Lys-49 (LOMONTE & RANGEL, 2012; MARAGANORE 1984). Apesar dessa substituição ser a mais encontrada nesse grupo, outros resíduos de aminoácidos também podem ocupar essa posição, como a serina, arginina, glutamina e asparagina (CONLON et al., 2013; MURAKAMI et al., 2008; WEI et al., 2006; BAO et al., 2005).

A ação das svPLA₂ sobre os tecidos do organismo gera distúrbios fisiopatológicos após o envenenamento ofídico, como efeitos miotóxicos, cardiotoxicos, neurotóxicos e alterações inflamatórias e hemostáticas (MAMEDE et al. 2016; BERNARDES et al., 2015; MOREIRA et al., 2014; RODRIGUES et al. 2014; TONELLO et al., 2012; RIGONI et al., 2008; MONTECUCCO et al., 2008; SANTOS-FILHO et al. 2008).

O mecanismo de indução de danos celulares pelas svPLA₂ Asp-49 e svPLA₂ Lys-49 ocorre de forma diferente. A hidrólise de fosfolípídeos de membrana ocasionada pela atuação das svPLA₂ Asp-49 geram alterações irreversíveis às células, sendo que essa ação enzimática libera derivados lisofosfolipídicos, agentes que causam a desestruturação da membrana plasmática, aumentando a permeabilidade da mesma a íons (MORA-OBANDO et al., 2014; FERNÁNDEZ et al., 2013; HARRIS et al., 2013). Esse evento altera de

forma significativa o equilíbrio intracelular de íons K^+ , Na^+ e Cl^- e, conseqüentemente, ocorre alteração do potencial de membrana (RUGOLO et al., 1986).

As svPLA₂ Lys-49 independem de ação enzimática para causarem danos a nível celular. Essas proteínas atuam por meio de seus resíduos de aminoácidos catiônicos e hidrofóbicos/aromáticos presentes na posição C-terminal (FERNÁNDEZ et al., 2013; LOMONTE & GUTIÉRREZ, 2011), além de serem capazes de adentrar as células e interagir com componentes intracelulares, seguido de alterações no funcionamento celular (MASSIMINO et al., 2018). Apesar de terem mecanismos de ação diferentes, as svPLA₂ Asp-49 e as svPLA₂ Lys-49 possuem sinergia entre si, uma vez que a desestabilização de membrana após a hidrólise de fosfolípídeos ocasionada pelas Asp-49 produz novos sítios aniônicos nas membranas celulares que serão alvo das Lys-49, gerando distúrbios celulares irreversíveis (MORA-OBANDO et al., 2014; SHEN & CHO, 1995).

Além de atuarem na desestruturação de membranas biológicas, as svPLA₂ Asp-49 e Lys-49 podem atuar no material genético das células. Ambas as proteínas são capazes de ocasionar a formação de micronúcleos, os quais indicam quebras ou aneuploidias no DNA (SILVA et al., 2018a; MARCUSSI et al., 2013; FENECH et al., 2008). A presença de svPLA₂ no meio intracelular, inclusive em regiões nucleares, já foi observada após marcação de uma miotoxina (Mt-II) com o corante orgânico carboxitetrametilrodamina, além de colocalização com nucleolinas (MASSIMINO et al., 2018). Entretanto, o mecanismo intracelular de atuação das svPLA₂ ainda não está totalmente elucidado.

As svPLA₂ têm um papel significativo no acidente ofídico. Dessa forma, o estudo de seus mecanismos de ação possibilita o entendimento dos efeitos fisiopatológicos resultante dessas toxinas. Todavia, esses compostos são promissores agentes biotecnológicos e de relevante interesse para a medicina, uma vez que constituem moléculas bioativas com potencial terapêutico nas pesquisas contra o câncer, trombose, desordens cardiovasculares e inflamatórias, além de infecções por microrganismos patogênicos como bactérias, parasitas e vírus (CHEN et al., 2017; SHANBHAG, 2015; MADUWAGE; ISBISTER, 2014; CASTILHO et al., 2012; SAMY et al., 2011).

1.3.1. BaltPLA₂

A peçonha da serpente *Bothrops alternatus* é constituída por inúmeras proteínas, sendo uma pequena fração (7,8 %) representada pelas svPLA₂. Apesar de baixa representatividade na peçonha bruta, as svPLA₂ têm um papel importante no envenenamento ofídico (ÖHLER et al., 2010). Dentre as várias fosfolipases purificadas de *B. alternatus* encontra-se a BaltPLA₂, uma svPLA₂ ácida com pI de 4,4 e massa molecular aparente de 17 kDa pela eletroforese em poliacrilamida e 14 kDa pela espectrometria de massas. A expressiva atividade catalítica da BaltPLA₂ enquadra essa toxina no grupo das Asp-49, além de proporcionar diversas atividades biológicas, como modulação da hemostasia devida sua ação anticoagulante, inibição da agregação plaquetária induzida pela epinefrina e adenosina difosfato, indução de mionecrose *in vivo* e a produção de citocinas pró-inflamatórias *in vitro* (DIAS et al., 2018). Por outro lado, são necessários mais estudos para elucidar o mecanismo de ação dessa toxina sobre células e, conseqüentemente, aprofundar em suas possíveis atividades terapêuticas.

1.4. Pontos quânticos

Nos últimos anos, a procura por novas alternativas para o estudo de biomoléculas em sistemas orgânicos cresceu consideravelmente, o que possibilita o entendimento dos mecanismos de ação das mesmas tanto *in vivo* quanto *in vitro* (HOCKING et al., 2013).

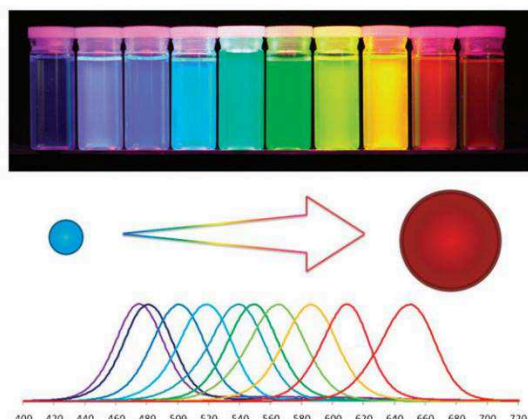
Em virtude da alta especificidade e sensibilidade, as metodologias científicas baseadas em fluorescência são de extrema importância para esclarecer eventos biológicos (SHASHKOVA & LEAKE, 2017). Sondas fluorescentes a base de corantes orgânicos têm se mostrado eficazes na identificação de biomoléculas (YAN et al., 2017; MARTYNOV et al., 2016; JUREK et al., 2015; WARRIER, 2014). Entretanto, algumas desvantagens na utilização dessas sondas devem ser consideradas, como a alta taxa de fotodegradação e o amplo espectro de emissão (OLIVEIRA et al., 2018).

Os pontos quânticos (PQs) são nanocristais semicondutores que suas propriedades de absorção e emissão podem ser sintonizadas em função do tamanho, forma e composição (SILVA et al., 2018b; SMITH & NIE, 2010; IIKAWA et al., 2004). Além disso, são fotoestáveis e apresentam alta absorvidade diferentemente dos corantes tradicionais. Essas características tornam os PQs importantes ferramentas luminescentes na monitoração de sistemas biológicos (EKIMOV & ONUSHCHENKO, 1981; MARTYNENKO et al., 2017; GOTO et al., 2016; ZHUO et al., 2012; ROSENTHAL et al., 2011).

Os PQs mais utilizados são constituídos essencialmente de metais como o cádmio (Cd), chumbo (Pb) ou zinco (Zn), que podem ser associados aos calcogênios (oxigênio, enxofre, selênio, telúrio e polônio), elementos químicos do grupo VI A da tabela periódica, para formar nanopartículas de CdS, ZnS, CdSe e CdTe. A produção dos PQs ocorre por métodos físicos, como o aquecimento por micro-ondas, microemulsão e irradiação ultra-sônica, ou métodos de química coloidal, os quais são dependentes de surfactantes ou solventes orgânicos (PU et al., 2018; MAL et al., 2016).

A visualização de fluorescência dos pontos quânticos baseia-se na propriedade dessas nanopartículas de emitir luz quando excitados por fótons (SHIRASAKI et al., 2013; DVOYAN et al., 2011; SCHOLES et al., 2006). Esse mecanismo consiste na absorção de energia eletromagnética pelos elétrons, sendo maior ou igual ao *gap* do PQs, os elétrons realizam transições eletrônicas para a banda de condução, termalizam e recombinam com o buraco na banda de valência emitindo radiação eletromagnética de energia menor que a absorvida, podendo variar do azul ao vermelho nos PQs de calcogenetos de cádmio (NIENHAUS et al., 2015). A propriedade de emissão de luz pelos PQs depende do seu tamanho, quanto maior sua estrutura maior o comprimento de onda emitido (Figura 5) (ZRAZHEVSKIY et al., 2010; WALKEY et al., 2009).

Figura 5. Emissão de luz de acordo com o tamanho dos PQs.



Fonte: ZRAZHEVSKIY et al., 2010

A fotoestabilidade dos pontos quânticos é uma das características que viabiliza a sua utilização frente aos corantes orgânicos fluorescentes, uma vez que estes últimos são fotossensíveis (RESCH-GENGER et al., 2008; SWENSON et al., 2007; BERLIER et al., 2003). A ampla absorção de energia eletromagnética, a emissão em estreitas bandas e o coeficiente de extinção molar está associada à estabilidade dos PQs, o que gera bastante interesse nas áreas biológicas (BIJU et al., 2008; SOMERS et al., 2006; LEATHERDALE et al., 2002).

A toxicidade dos pontos quânticos é determinada pelas suas propriedades físico-químicas, tais como concentração, revestimento e tamanho (BELL et al., 2018; LIU et al., 2017; HASSAN et al., 2016). A influência dos PQs na maquinaria celular pode ocorrer de várias maneiras, como a indução de estresse oxidativo, genotoxicidade, disfunção mitocondrial e ruptura lisossomal, dentre outras (WANG et al., 2018; MU et al., 2017; WANG et al., 2015). Assim, visando à aplicabilidade em sistemas biológicos, a funcionalização dos pontos quânticos com materiais inertes e não tóxicos é de fundamental importância para minimizar estes problemas.

Com o objetivo de reduzir essa citotoxicidade, os PQs são funcionalizados/estabilizados com compostos químicos na tentativa de diminuir os danos celulares gerados *in vivo* e *in vitro*, pois adquirem maior solubilidade em meio aquoso e viabilizam a bioconjugação com outras moléculas (KARAKOTI et al., 2015). Na maioria dos casos, a funcionalização fundamenta-se no

revestimento do nanocristal com monocamadas de ligantes hidrofílicos ou grupos funcionais (WENGER & HILDEBRANDT, 2017; KUMARI et al., 2017; SMITH et al., 2006). Essas modificações minimizam as ligações não específicas dos PQs com componentes biológicos (LIU et al., 2008; SUSUMU et al., 2007). Por outro lado, o revestimento dos PQs necessita de alta estabilidade, uma vez que a toxicidade dos mesmos aumenta com o diâmetro da partícula (ZHU et al., 2012). Além disso, existe a possibilidade de acúmulo de PQs nos tecidos em função de degradações de íons adsorvidos na superfície dos PQs, causando toxicidade celular (PACE et al., 2010; MANCINI et al., 2008).

Os pontos quânticos podem ser bioconjugados com diferentes moléculas biológicas, como enzimas, anticorpos e DNA (FRANCIS et al., 2017; BANERJEE et al., 2016; IYER et al., 2014). Tradicionalmente, as biomoléculas são conjugadas na superfície dos PQs por meio de ligações covalentes cruzadas ou pelo processo de adsorção não covalente induzidos quimicamente (UTKIN et al., 2017; YONG et al., 2012; XING et al., 2007). Contudo, conhecer a estrutura tanto das nanopartículas, quanto da biomolécula é essencial para a realização da bioconjugação.

A capacidade de conjugação torna os PQs novas ferramentas no estudo de proteínas específicas, auxiliando o entendimento de processos como localização, interações e movimentação dessas biomoléculas em sistemas vivos por meio de imagens fluorescentes (KOSHMAN et al., 2008). A possibilidade de rastreamento de proteínas constitutivas ou de toxinas exógenas utilizando os pontos quânticos já é uma realidade (RODRIGUES, 2017; UTKIN et al., 2017; VALENTINE et al., 2012; KOSHMAN et al., 2008).

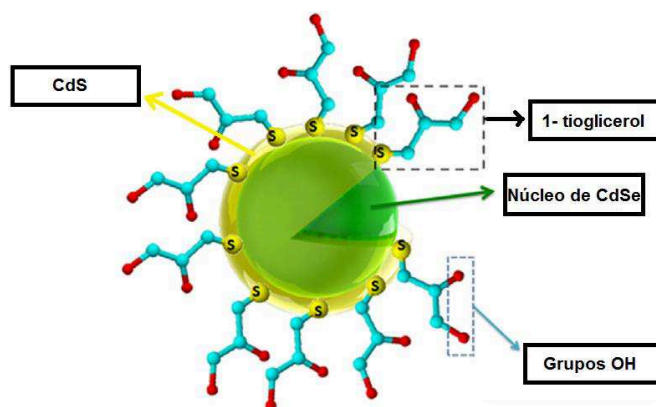
1.4.1. Pontos quânticos de tamanhos mágicos

Os pontos quânticos de tamanhos mágicos (MSPQs) se diferem dos PQs tradicionais pelo tamanho extremamente pequeno (<2 nm de diâmetro), alta estabilidade de tamanho e luminescência, bem como um amplo espectro de emissão (SILVA et al., 2014a; BERI et al., 2011; XIA & ZHU,

2008). Essa nomenclatura dos MSPQs é determinada pela limitada quantidade de átomos em suas estruturas (KUZNETSOV et al., 2012; CHEN et al., 2005).

Os MSPQs constituídos de seleneto de cádmio (CdSe) são estruturas ultrapequenas que exibem um espectro de emissão de 420 a 710 nanômetros, tornando-as versáteis para aplicações distintas (HARRELL et al., 2013). Além disso, há a possibilidade de melhorar a biocompatibilidade e intensidade de luminescência dos PQs de CdSe revestindo com uma casca de CdS e gerando nanocristais de núcleo/casca de CdSe/CdS (SILVA et al., 2014b; SILVA et al., 2014c; SILVA et al., 2013). Estruturalmente, essas nanopartículas são formadas por um núcleo de cádmio/selênio revestido por uma monocamada de átomos de CdS. Ainda mais externamente, tem-se a funcionalização com moléculas de 1-tioglicerol, as quais contêm em suas extremidades grupos hidroxila (Figura 6) (SILVA et al., 2014a).

Figura 6. Estrutura simplificada dos MSPQs de CdSe/CdS. O núcleo de cádmio (em verde), monocamada de átomos CdS (em amarelo) e funcionalização com moléculas de 1-tioglicerol (azul). Os grupos hidroxila estão representados em vermelho.



Fonte: Adaptado de SILVA et al., 2014a

A citotoxicidade dos MSPQs de cádmio em sistemas biológicos é dependente dos íons de cádmio adsorvidos na superfície, sendo liberados e ocasionando alterações celulares relevantes (SILVA et al., 2014b; LI et al., 2009). Dessa forma, meios de reduzir essa possibilidade são de grande importância para viabilizar a utilização dos mesmos em estudos de moléculas biológicas, o que

pode ser superado pela funcionalização de suas superfícies com substâncias inertes (UNNI et al., 2008). Assim, a formação de uma casca de CdS ao redor dos MSPQs de CdSe diminui a presença desses íons, reduzindo danos celulares gerados por esses nanocristais (SILVA et al., 2014b; SILVA et al., 2016). Essa modificação na superfície dos pontos quânticos associadas à sua produção em soluções aquosas e a funcionalização com o 1-tioglicerol aumentam a biocompatibilidade em ensaios *in vitro* e impedem reações de imunogenicidade deses MSPQs de CdSe/CdS (SILVA et al., 2016; SILVA et al., 2014; SILVA et al., 2013).

Em virtude das propriedades físico-químicas e biológicas dos MSPQs de CdSe/CdS, como a fotoestabilidade, alta absorvidade molar, a alta eficiência quântica, tamanho extremamente pequeno, amplo espectro de emissão, estabilidade do tamanho e luminescência, biocompatibilidade esses MSPQs são excelentes ferramentas para o desenvolvimento de sondas que proporcionem a detecção, localização e rastreamento de biomoléculas *in vivo* e *in vitro*, superando as sondas fluorescentes convencionais (KOVTUN et al., 2018; SILVA et al., 2016). Em virtude disso, os MSPQs podem ser utilizados no estudo das toxinas ofídicas. Em função dos variados efeitos fisiopatológicos das svPLA₂, é necessário o desenvolvimento de sondas estáveis para a detecção e rastreamento destas proteínas. Dessa forma, justifica-se a utilização dos MSPQs de CdSe/CdS para o rastreamento da BaltPLA₂ em mioblastos a fim de analisar os locais de ação dessa proteína a nível celular, que podem auxiliar no entendimento dos mecanismos mionecróticos da mesma.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Rastrear a fosfolipase BaltPLA₂ conjugada espontaneamente com pontos quânticos de tamanhos mágicos de CdSe em células *in vitro* e investigar sua atividade antiviral.

2.2. Objetivos específicos

- Realizar a bioconjugação espontânea dos MSPQs de CdSe/CdS com a BaltPLA₂;
- Localizar a BaltPLA₂ em cultura de mioblastos;
- Analisar a ação antiviral da BaltPLA₂ sobre o vírus da dengue sorotipo 2.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Isolamento da BaltPLA₂

A enzima BaltPLA₂ foi isolada previamente a partir da peçonha bruta da serpente *Bothrops alternatus*. A peçonha foi adquirida do Serpentário Bioagents (Batatais - São Paulo), onde, após a coleta, a mesma foi imediatamente dessecada a vácuo, à temperatura ambiente e conservada a -20°C até o momento do uso.

Os passos de isolamento da BaltPLA₂ foram descritos pelo nosso grupo de estudo do Laboratório de Biologia Molecular e Celular do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal de Uberlândia (DIAS et al., 2018). Resumidamente, a peçonha bruta foi submetida a uma cromatografia de troca iônica em coluna DEAE-Sephacel (1,5 centímetros de diâmetro x 15 cm de comprimento) com gradiente crescente de tampão contendo bicarbonato de amônia (0,05 a 1 M, pH 7,8). Em seguida, foi realizada uma cromatografia de interação hidrofóbica em coluna Phenyl-Sepharose (1,5 cm x 2,5 cm) com gradiente decrescente de NaCl (4 a 0 M). A fração contendo a BaltPLA₂ foi quantificada pelo método de BRADFORD (1976) e estocada a -20°C até o momento do uso.

3.2. Síntese e caracterização física dos MSPQs de CdSe/CdS

A síntese dos pontos quânticos de tamanhos mágicos de CdSe/CdS foi realizada em solução aquosa coloidal como descrita por SILVA e colaboradores (2014). Em suma, foi utilizada uma solução contendo 1 mmol de NaHSe e 2 mmol de NaBH₄ e 40 mL de água ultrapura preparada em frasco de três gargalos sob atmosfera inerte de argônio. Uma segunda solução foi preparada contendo 4 mmol de Cd(ClO₄)₂, 4 mmol de 1-tioglicerol e 10 mL de água ultrapura. A liga de CdSe_{1-x}S_x e a casca de CdS torno do CdSe foram desenvolvidos de acordo com a metodologia descrita por SILVA (2014).

Os espectros de absorção ótica foram registrados à temperatura ambiente usando um espectrofotômetro UV-VIS-NIR de feixe duplo (UV-3600, Shimadzu,

Kyoto, Japão) a uma resolução espectral de 1 nm. Já os espectros de fluorescência foram registrados com excitação a 380 nm com um espectrofotômetro Cary Eclipse (Varian Medical Systems, Califórnia, Estados Unidos da América). As imagens de AFM dos MSPQs foram adquiridas à temperatura ambiente utilizando um microscópio de força atômica (SPM-9600, Shimadzu). As soluções aquosas contendo os MSPQs de CdSe/CdS foram diluídas e gotejadas sobre um substrato de mica e secas com nitrogênio gasoso, com base na metodologia publicada por DANTAS e colaboradores (2012).

3.3. Ensaios de bioconjugação dos MSPQs de CdSe/CdS e a BaltPLA₂

3.3.1. Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR)

Os MSPQs de CdSe/CdS e a BaltPLA₂ foram dispersos em água esterilizada sem qualquer tratamento adicional para a concentração de 2 µg/µL e 1 µg/µL, respectivamente, em volume final de 20 µL, seguido de incubação à temperatura ambiente por 15 min. Em seguida, essa solução foi submetida à técnica de Espectroscopia de Infravermelho (IR) com Transformada de Fourier (FT-IR) por meio do espectrofotômetro Shimadzu Fourier IR (Vertex 70, Massachusetts, EUA) na faixa espectral de 830-4000 cm⁻¹ via refletância total atenuada (ATR). Para efeitos de comparação das alterações ocorridas no bioconjugado, foram obtidos separadamente os perfis de FT-IR dos MSPQs de CdSe/CdS MSQDs a 2 µg/µL e da BaltPLA₂ a 1 µg/µL.

3.3.2. Cromatografia de fase reversa

Primeiramente, a BaltPLA₂ (200 µg) foi incubada por 15 min a temperatura ambiente com diferentes quantidades de MSPQs de CdSe/CdS (20, 200 e 400 µg) em solução contendo o solvente A (0,065% de ácido trifluoroacético em água). Em seguida, essa solução foi submetida à cromatografia de fase reversa em coluna C2/C18 (0,46 cm × 10,0 cm) por meio do sistema ÄKTApurifier HPLC (GE Healthcare, Uppsala, Suécia). A coluna foi equilibrada com solvente A e

eluída por um gradiente de concentração de 0 a 100% com o solvente B (0,05% ácido trifluoroacético em acetonitrila) em um fluxo de 0,5 mL/min à temperatura ambiente. A absorbância foi monitorada a 280 nm.

3.3.3. Espectroscopia de Dicroísmo Circular

Os espectros foram obtidos na faixa de 195 a 260 nm com o espectrofotômetro de dicroísmo (CD) JASCO J-815 (Great Dunmow, Inglaterra) em cubetas de quartzo (1 mm). Após incubação de 15 min à temperatura ambiente dos MSPQs de CdSe/CdS com a BaltPLA₂ (concentração final de 0,5 mg/mL) do conjugado, foi realizada a espectroscopia de dicroísmo circular em Tris-HCl a 0,01M, pH 7,5 para avaliação das mudanças conformacionais nos espectros do bioconjugado e da BaltPLA₂ isolada. Os espectros foram tipicamente registrados como uma média de 15 *scans* e normalizados a elipticidade usando a seguinte equação: $[\theta]_{m\text{rw}} = \text{deg.} \times \text{cm}^2/\text{dmol} \times 10^{-3}$.

3.4. Ensaios biológicos com o bioconjugado ou com a BaltPLA₂ isolada

3.4.1. Atividade fosfolipásica

A atividade fosfolipásica da BaltPLA₂ foi determinada pela ação hemolítica indireta de acordo com a metodologia descrita anteriormente por GUTIÉRREZ e colaboradores (1988). Primeiramente, um gel de agarose 1% suplementado com gema de ovo e eritrócitos humanos foi confeccionado e, após solidificação do mesmo, foram feitos orifícios de tamanho uniforme (5 mm de diâmetro). Em seguida, 50 µL de solução salina tamponada com fosfato (PBS) contendo 10 µg de BaltPLA₂ e 20 µg de MSPQs de CdSe/CdS foi pré-incubada por 15 minutos à temperatura ambiente, seguido de adição no orifício do gel. Soluções de 50 µL de PBS contendo separadamente a peçonha bruta de *B. alternatus* (10 µg), os MSPQs de CdSe/CdS (20 µg), a BaltPLA₂ (10 µg) e apenas PBS (50 µL) também foram adicionadas em seus respectivos orifícios no gel.

O gel, contendo as amostras, foi mantido à temperatura ambiente por 24h e a atividade hemolítica indireta foi identificada pela formação de halos translúcidos

no gel. Estes halos indicam a hidrólise de fosfolípidios presentes na gema de ovoe os produtos desta lise ocasionam o rompimento da membrana dos eritrócitos (HABERMANN & HARDT, 1972). Os resultados foram expressos em milímetros quadrados (mm^2) e as análises estatísticas foram realizadas pelo método one-way ANOVA com o teste pós-teste de Bonferroni. Todos os ensaios foram feitos em triplicatas.

3.4.2. Cultura de mioblastos

Os mioblastos (linhagem C2C12 de células de camundongo) foram utilizados para avaliar os bioconjugados de MSPQs de CdSe/CdS com a BaltPLA₂ e estudar a localização da toxina nessas células. As células foram mantidas em meio de cultura Roswell Park Instituto Memorial (RPMI) 1640 (Gibco/Invitrogen, Carlsbad, EUA) suplementado com soro fetal bovino (SFB) 10%, HEPES 25 mM, penicilina 100 U/mL, estreptomicina 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, L-glutamina 2 mM e bicarbonato de sódio 3 mM em estufa a 37° C sob atmosfera umidificada e CO₂ 5%.

3.4.3. Rastreamento da BaltPLA₂ etiquetada com os MSPQs de CdSe/CdS

Os mioblastos 8×10^3 células/poço foram colocados em placa de 96 poços, seguido de incubação por 24 h a 37° C e 5% de CO₂. Em seguida, o sobrenadante foi descartado, as células lavadas com PBS e incubadas com 200 $\mu\text{L}/\text{poço}$ de meio RPMI suplementado com SFB 2% contendo MSPQs de CdSe/CdS 200 ng/ μL ou MSPQs de CdSe/CdS MSQDs 200 ng/ μL + BaltPLA₂ 100 ng/ μL por 18 h ou 32 h a 37° C e 5% de CO₂. As imagens foram adquiridas nos tempos especificados usando o microscópio invertido de fluorescência (EVOS fl-AMG, Seattle, EUA) com excitação em 470 nm e as emissões foram capturadas usando filtro de 525 nm.

3.4.4. Obtenção de soro anti-BaltPLA₂ em camundongos

Neste trabalho, foram utilizados camundongos Balb/c fêmeas (20-25 g) obtidos do Centro de Bioterismo e Experimentação Animal (CEBEA) da Universidade Federal de Uberlândia. Os animais foram mantidos em condições controladas de

temperatura (22 ± 2 °C), umidade (60-70%) e ciclos de claro/escuro (12 h) com livre acesso a comida e água. Os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética na Utilização de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Uberlândia sob o protocolo de 065/17.

Para a produção de soro anti-BaltPLA₂, três camundongos foram submetidos a imunizações com três doses/animal (com intervalo de 15 dias entre cada dose) por meio de injeções intraperitoneais contendo 100 µL de BaltPLA₂ a 25 µg/mL ou 100 µL de PBS como controle negativo, sendo que antes da inoculação as amostras foram acrescidas de 100 µL de adjuvante a base de hidróxido de alumínio (Alum, Invivogen, Toulouse, França), totalizando 200 µL de solução por animal em cada imunização. O sangue dos animais foi coletado 15 dias após a última dose e incubado por uma hora a 37°C, seguido de centrifugação a 1000 xg para obtenção do soro. O mesmo foi acondicionado a -20° C até o momento do uso.

3.4.5. Imunofluorescência indireta para detecção da BaltPLA₂

A imunofluorescência indireta (IFI) foi realizada de acordo com DAVOLI-FERREIRA e colaboradores (2016) com algumas modificações. Primeiramente, foi adicionado 1×10^4 mioblastos/poço em placa de 96 poços com posterior incubação por 24 h a 37° C e CO₂ 5%. Então, as células foram tratadas em triplicatas com 200 µL/poço de meio RPMI suplementado com 2% de SFB contendo a BaltPLA₂ a 12,5 µg/mL ou com meio como controle negativo. Após 24 h de incubação, o sobrenadante foi removido, as células lavadas com PBS e fixadas com uma solução de formaldeído a 4% durante 20 min à temperatura ambiente. Em seguida, os poços foram lavados novamente com PBS e as células incubadas por 1 h à temperatura ambiente com 100 µL de uma solução contendo TritonTM X-100 a 1% e albumina sérica bovina (BSA) a 2%. Após esse tempo, uma nova lavagem dos poços com PBS foi realizada e as células foram incubadas por 1 h com 100 µL soro anti-BaltPLA₂ diluído 1:10 em Tween 0,05% e BSA 0,5%. Uma última lavagem com PBS foi feita, seguido da adição de anticorpos IgG de camundongo conjugados com Alexa Fluor 488 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, EUA) diluídos 1:1000 em solução de 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) 300 nM. Uma hora após incubação à temperatura ambiente, as

células foram lavadas com PBS e as imagens adquiridas usando um filtro de 525 nm no microscópio invertido de fluorescência (EVOS).

3.5. Atividade antiviral da BaltPLA₂

3.5.1. Cultura de células Vero e vírus

Células Vero (ATCC® CCL-81™) foram mantidas em meio DMEM GlutaMAX (Gibco/Invitrogen, Carlsbad) suplementado com SFB 10%, penicilina 100 U/mL, estreptomicina 100 µg/mL e anfotericina B 2 µg/mL a 37°C e CO₂. O vírus da dengue sorotipo 2 (DENV2) foi propagado em células C6/36, de *Aedes albopictus* e titulado pelo método de TCID₅₀ como descrito por LABARRE & LOWY (2001). O estoque viral foi armazenado a -80°C até o momento dos ensaios antivirais.

3.5.2. Citotoxicidade da BaltPLA₂ em células Vero

O teste de toxicidade da BaltPLA₂ em células Vero foi realizado pelo método de MTT ([3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina]) como descrito por Mosmann (1983) e modificações de Sieuwersts et al (1995). A quantidade de 2 x10⁴ células/poço foi adicionada em triplicatas em placa de cultura de 96 poços e incubada a 37° C e CO₂ a 5%. Após de 24 h de incubação, a monocamada foi tratada com 200 µL/poço de DMEM suplementado com SFB 2% contendo a BaltPLA₂ nas concentrações de 25, 50, 100 e 300 µg/mL. A placa foi mantida por seis dias a 37° C e CO₂ 5%. Células mantidas apenas com meio de cultura suplementado com SFB 2% foram utilizadas como controle negativo. No sexto dia, o sobrenadante foi retirado, as células lavadas com PBS e adicionados 50 µL/poço de meio de cultura contendo 1 mg/mL de MTT. Após a incubação da placa por 1 h a 37° C e CO₂ 5%, o sobrenadante foi descartado e adicionados 100 µL/poço de dimetilsulfóxido (DMSO) para solubilização dos cristais de formazan, seguido de leitura de absorbância em espectrofotômetro a um comprimento de onda de 560 nm. Assim, foi calculada a concentração citotóxica para 50% das células (CC₅₀) de acordo com a fórmula abaixo:

$$Ct (\%) = 100 - \left(\frac{DO_{mt}}{DO_{cc}} \times 100 \right)$$

Onde:

Ct (%) = porcentagem de citotoxicidade

DO_{mt} = absorvância nos poços tratados

DO_{cc} = média da absorvância dos poços usados como controle (sem BaltPLA₂).

3.5.3. Ensaio virucida

A quantidade de 2×10^4 células/poço foi adicionada em placas de 96 poços, incubadas por 24 h a 37°C e CO₂ 5%. Após esse tempo, foram incubados $33,6 \pm 0,17$ TCID₅₀ do DENV2 com concentrações não citotóxicas da BaltPLA₂ (25, 50 e 100 µg/mL) em volume de 100 µL por 2 h a 37°C. Em seguida, essa mistura foi adicionada à monocamada de células Vero e, após 1 h de incubação, o sobrenadante foi descartado, seguido da adição de 200 µL/poço de DMEM contendo SFB 2% e incubação por seis dias a 37°C e 5% de CO₂.

A avaliação da atividade antiviral da BaltPLA₂ foi mensurada por meio do ensaio de MTT como descrito anteriormente. Assim, no sexto dia de incubação após a adição da mistura de DENV2 e BaltPLA₂, o sobrenadante foi descartado e os poços lavados com PBS. Em seguida, foi realizado o ensaio de MTT e a concentração de BaltPLA₂ capaz de reduzir 50% da atividade citotóxica do vírus (EC₅₀) foi determinada pelo software GraphPad Prism versão 5.0 utilizando a análise de regressão não-linear. A partir dos dados de CC₅₀ e EC₅₀ da BaltPLA₂ foi calculado o índice de seletividade (IS= CC₅₀/EC₅₀). Valores de IS acima de quatro sugerem potencial antiviral de determinada substância (AMOROS et al., 1992).

3.5.4. Ensaio de atividade antiviral por pré-tratamento

Células Vero ($2,0 \times 10^4$ células/poço) foram incubadas em placas de 96 poços por 24 h a 37°C e CO₂ 5%. Após este tempo, a monocamada foi tratada com 100 µL/poço de DMEN contendo a BaltPLA₂ nas concentrações de 25, 50 e 100 µg/mL. Após 2 h de incubação, o sobrenadante foi retirado, $33,6 \pm 0,17$ TCID₅₀ de DENV2 foram adicionados em cada poço e a placa foi incubada por 1h a 37° C. Em seguida, o sobrenadante foi descartado, os poços foram lavados com PBS e 200 µL/poço de DMEM suplementado com SFB 2% foram adicionados as células, seguido de incubação por 6 dias a 37° C e CO₂ 5%. Após seis dias, foi analisada a citotoxicidade gerada pelo vírus por do método de MTT, o EC₅₀ e o IS calculados como descrito no ensaio virucida.

3.5.5. Ensaio de atividade antiviral por pós-tratamento

As células Vero ($2,0 \times 10^4$ células/poço) foram cultivadas em placas de 96 poços por 24 h a 37° C e CO₂ 5%. Em seguida, foram adicionados $33,6 \pm 0,17$ TCID₅₀ do DENV2 por poço. Após 1 h de incubação, o sobrenadante foi retirado e 200 µL de DMEN suplementado com SFB 2% contendo a BaltPLA₂ nas concentrações de 25, 50 e 100 µg/mL foram adicionados por poço da placa. Depois de 6 dias de incubação, o sobrenadante foi retirado e a análise da citotoxicidade resultante da ação viral, o EC₅₀ e o IS foram calculados como descrito anteriormente.

3.5.6. Ensaio de adsorção

As células Vero ($2,0 \times 10^4$ células/poço) foram cultivadas em placas de 96 poços por 24 h a 37° C e CO₂ 5%. Após esse tempo, as mesmas foram incubadas a 4° C por 30 min, seguido de retirada do sobrenadante e adição de $33,6 \pm 0,17$ TCID₅₀ de DENV2, juntamente com 100 µL/poço de DMEM contendo a BaltPLA₂ nas concentrações finais de 25, 50 e 100 µg/mL. Após 2 h de incubação a 4°C, o sobrenadante foi retirado, os poços lavados com PBS e posterior adição de 200

μL /poço de DMEM suplementado com SFB 2% e incubação por 6 dias 37°C e CO_2 5%. No sexto dia foi realizado o método de MTT para verificar a citotoxicidade ocasionada pelo vírus e foram calculados EC_{50} e IS.

3.5.7. Ensaio de internalização

As células Vero ($2,0 \times 10^4$ células/poço) foram cultivadas em placas de 96 poços por 24 h a 37°C e CO_2 5%. Em seguida, as células foram mantidas a 4°C por 30 min, seguido de retirada do sobrenadante e incubação com $33,6 \pm 0,17$ TCID_{50} de DENV2 durante 2 h a 4°C . Após esse tempo, cada poço foi lavado com PBS e as células incubadas a 37°C por 5 min. Logo em seguida, as células foram tratadas com 100 μL /poço de DMEM contendo a BaltPLA₂ nas concentrações de 25, 50 e 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ por 2 h. Finalmente, cada poço foi lavado com tampão citrato (ácido cítrico 40 mM, KCl 10 mM, NaCl 137 mM, pH 3,0) PBS e adicionados 200 μL DMEM suplementado com SFB 2 %. A placa foi incubada por 6 dias a 37°C e CO_2 5%, seguido da realização do método de MTT e cálculo de EC_{50} e IS.

3.5.8. Imunofluorescência indireta para o DENV2

Para obtenção de anticorpos contra o DENV2, foi realizada a inativação térmica do vírus a 70°C por 1 h de acordo com JONGES e colaboradores (2010). Três camundongos Balb/c fêmeas foram imunizadas com uma dose de 15 μL /animal de solução contendo DENV2 inativado a cada 15 dias, totalizando três doses quinze dias após a última dose. Os animais foram sacrificados e seu sangue foi retirado para obtenção do soro que foi utilizado na imunofluorescência indireta (IFI).

Primeiramente, foram realizados os testes de atividade virucida e pós-tratamento como mencionados nos itens 3.5.3 e 3.5.5, respectivamente. Entretanto, foi utilizada em ambos os testes apenas a concentração de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de BaltPLA₂. No sexto dia de ensaios antivirais, a IFI foi realizada de acordo com o protocolo descrito por DAVOLI-FERREIRA e colaboradores (2016) e, brevemente,

mencionado no item 3.4.5. As imagens foram capturadas por microscopia de fluorescência.

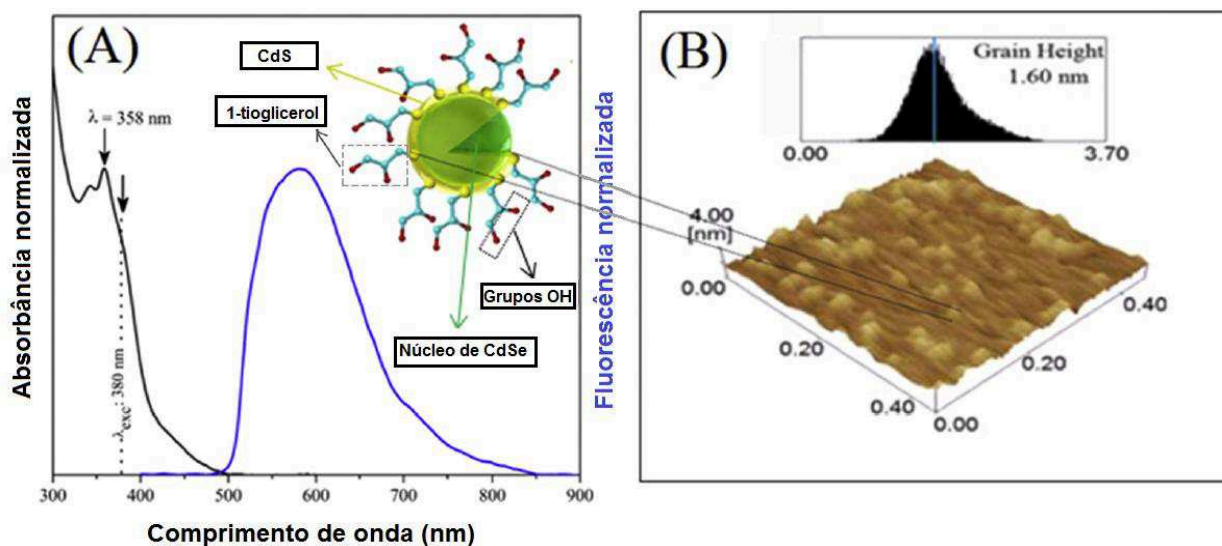
4. RESULTADOS

4.1. Caracterização física dos MSPQs de CdSe/CdS

A caracterização óptica dos MSPQs de CdSe/CdS foi realizada utilizando um espectrômetro UV-VIS-NIR e a caracterização morfológica foi feita com base na imagem de AFM utilizando um microscópio de força atômica.

Nos espectros de absorção e fluorescência observa-se bandas estreitas de absorção e uma banda larga de emissão, características de MSPQs de CdSe/CdS (Figura 7A). O amplo espectro de emissão é interessante, pois possibilita a detecção desses MSPQs por microscopia de fluorescência usando dois filtros (verde e vermelho). Na imagem de AFM observa-se que os MSPQs CdSe/CdS têm um diâmetro de aproximadamente 1,6 nm e apresentam morfologia esférica (Figura 7B).

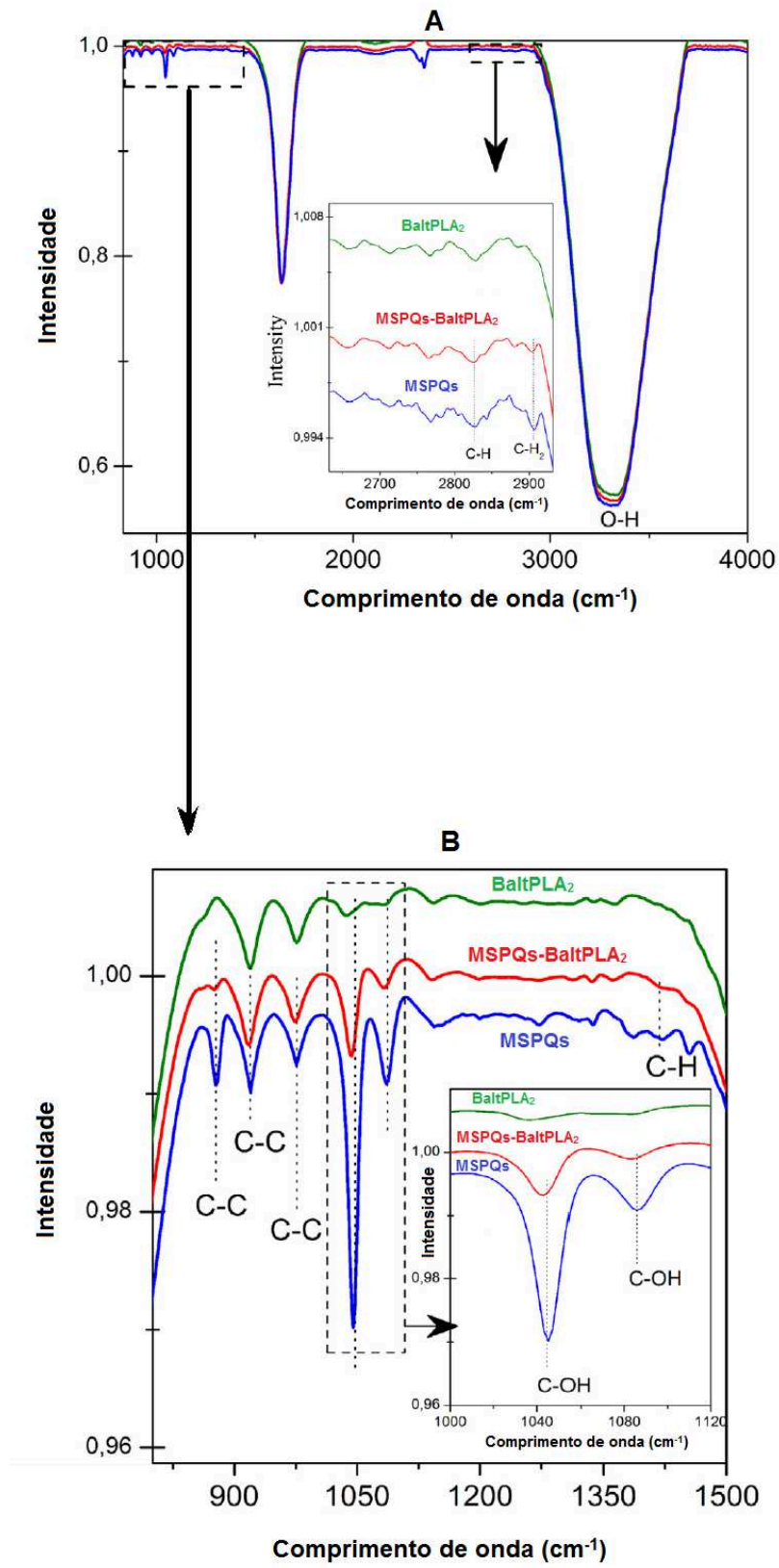
Figura 7. Caracterização física dos MSPQs de CdSe/CdS. **(A)** espectro de absorção e de fluorescência (resolução de 1 nm). Unidades arbitrárias são definidas como relativas às bandas mais intensas, que são determinadas como 1. As linhas pretas e azuis representam os espectros de absorção e emissão normalizados, respectivamente. **(B)** Imagem de microscopia de força atômica demonstrando o tamanho e morfologia dos MSPQs.



4.2. Bioconjugação dos MSPQs de CdSe/CdS com a BaltPLA₂

A análise da BaltPLA₂, dos MSPQs de CdSe/CdS e da BaltPLA₂ etiquetada com os MSPQs de CdSe/CdS (MSPQs-BaltPLA₂) por FT-IR revelou alterações evidentes em duas regiões: A (850–1500 cm⁻¹) e B (2630-2930 cm⁻¹). Na região A, bandas foram observadas em 2825 e 2910 cm⁻¹. A intensidade da última banda foi diminuída nos espectros do bioconjugado (Figura 8). Na região B, foram observadas bandas no intervalo de 870-980 cm⁻¹ e em regiões específicas como 1046, 1086 e 1421 cm⁻¹. Os espectros do bioconjugado MSPQs-BaltPLA₂ mostraram uma diminuição de intensidade nas bandas 877, 1086 e 1421 cm⁻¹ comparada com os espectros apenas dos MSPQs. Esses resultados sugerem que a interação da BaltPLA₂ com os MSPQs ocorre entre hidrocarbonetos alifáticos da toxina e hidroxilas do 1-tioglicerol dos PQs.

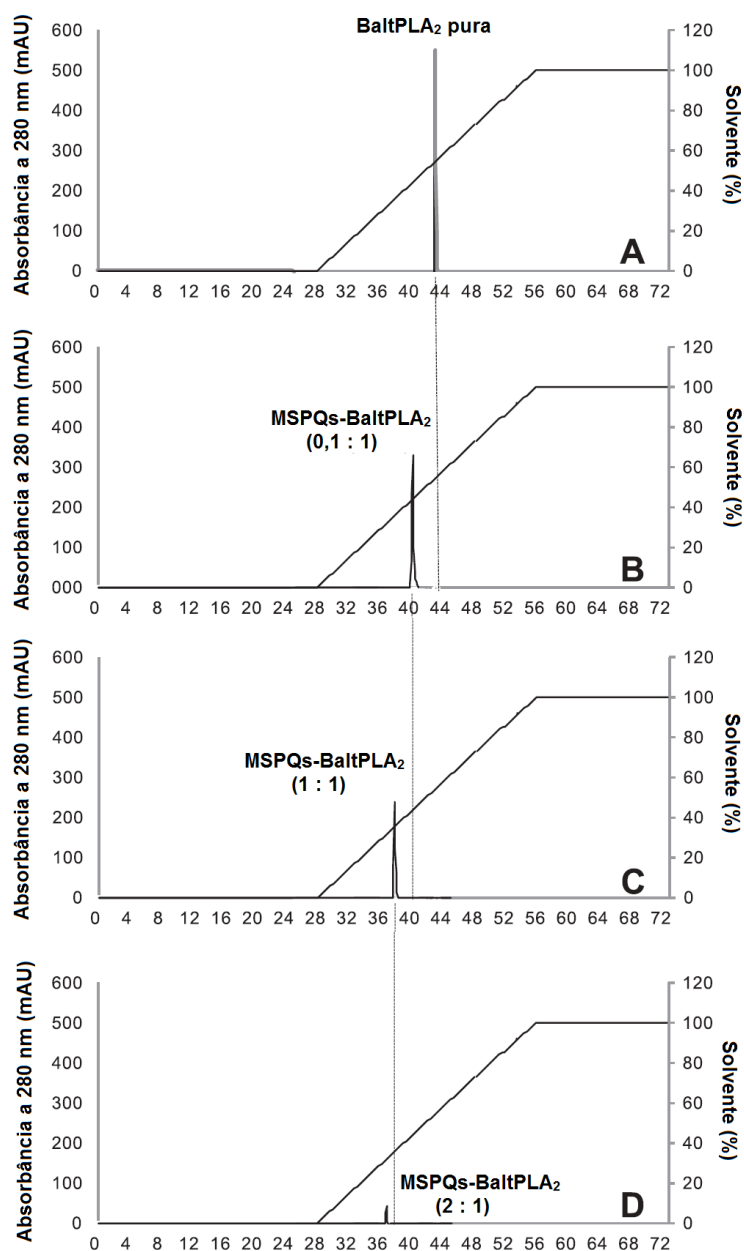
Figura 8. Espectroscopia de infravermelho (IR) com Transformada de Fourier (FT-IR) da BaltPLA₂, MSPQs e MSPQs-BaltPLA₂. As soluções aquosas foram analisadas em faixa espectral de 830-4000 cm⁻¹ usando um modo de refletância total atenuada (ATR).



4.3. Cromatografia de fase reversa

Os testes de cromatografia de fase reversa do bioconjugado MSPQs-BaltPLA₂ mostraram uma redução de intensidade do pico de absorção da BaltPLA₂ quando incubada com concentrações crescentes de MSPQs (Figura 9A). Ainda, houve o deslocamento desse mesmo pico para a esquerda comparado ao perfil cromatográfico da BaltPLA₂ pura (Figura 9B-D).

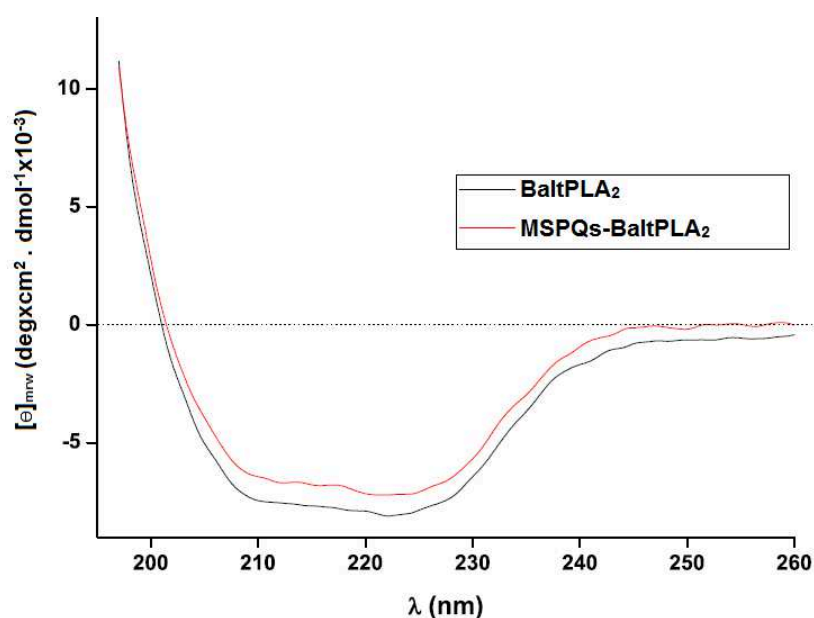
Figura 9. Cromatografia de fase reversa em coluna C2/C3. A BaltPLA₂ (200 µg) foi incubada brevemente com diferentes concentrações de MSPQs (20, 200 e 400 µg). **(A)** BaltPLA₂ pura (não conjugada), **(B)** MSPQs-BaltPLA₂ na proporção (massa/massa) de 0,1:1, **(C)** MSPQs-BaltPLA₂ na proporção (massa/massa) de 1:1. **(D)** MSPQs-BaltPLA₂ na proporção (massa/massa) de 2:1.



4.4. Espectroscopia de dicroísmo circular

A partir do espectro de dicroísmo circular da BaltPLA₂ e do bioconjugado MSPQs-BaltPLA₂, obteve-se um perfil característico de proteínas helicoidais, incluindo picos a 208 e 222 nm, que indicam que a interação da BaltPLA₂ com os MSPQs de CdSe/CdS não provoca mudança na estrutura tridimensional da toxina (Figura 10).

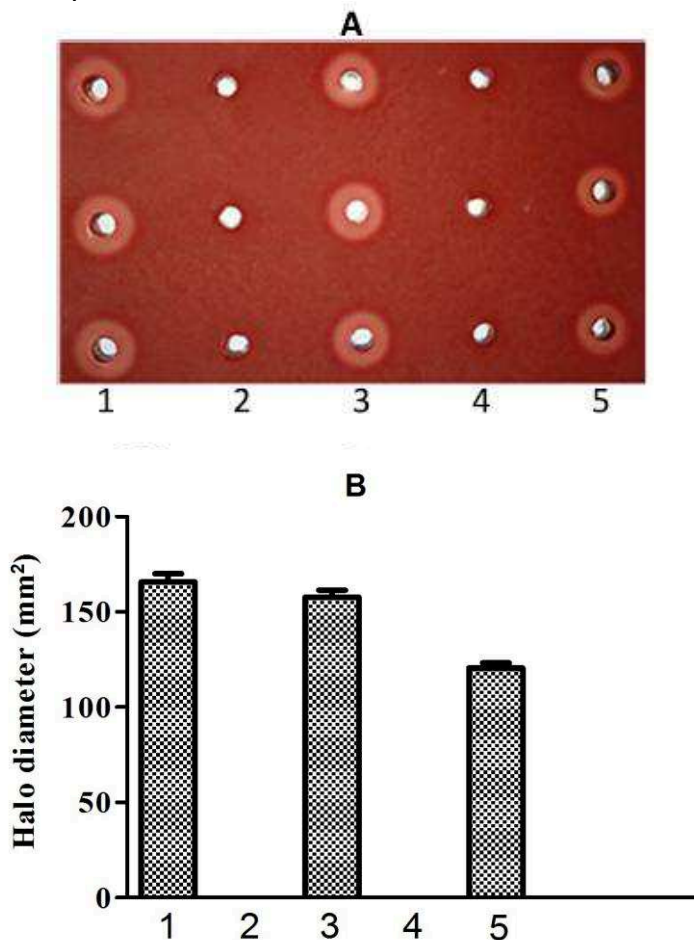
Figura 10. Espectro de dicroísmo circular da BaltPLA₂ e dos MSPQs-BaltPLA₂.



4.5. Atividade fosfolipásica

Os ensaios de atividade hemolítica indireta mostraram que a interação dos MSPQs com a BaltPLA₂ não altera de forma estatisticamente significativa a ação enzimática da toxina, uma vez que o diâmetro dos halos formados entre a BaltPLA₂ isolada ($153,3 \pm 5,8 \text{ mm}^2$) e o MSPQs-BaltPLA₂ ($163,3 \pm 5,8 \text{ mm}^2$) foi semelhante, o que indica apenas uma pequena redução de atividade fosfolipásica no bioconjugado (Figura 11).

Figura 11. Atividade hemolítica indireta. (A) Gel de agarose mostrando a formação dos halos translúcidos. 1: BaltPLA₂; 2: MSPQs de CdSe/CdS; 3: MSPQs-BaltPLA₂; 4: PBS; 5: peçonha bruta de *B. alternatus*. (B) Análise quantitativa. Os testes foram realizados em triplicatas e analisados pelo método ANOVA One-Way com pós-teste de Bonferroni.

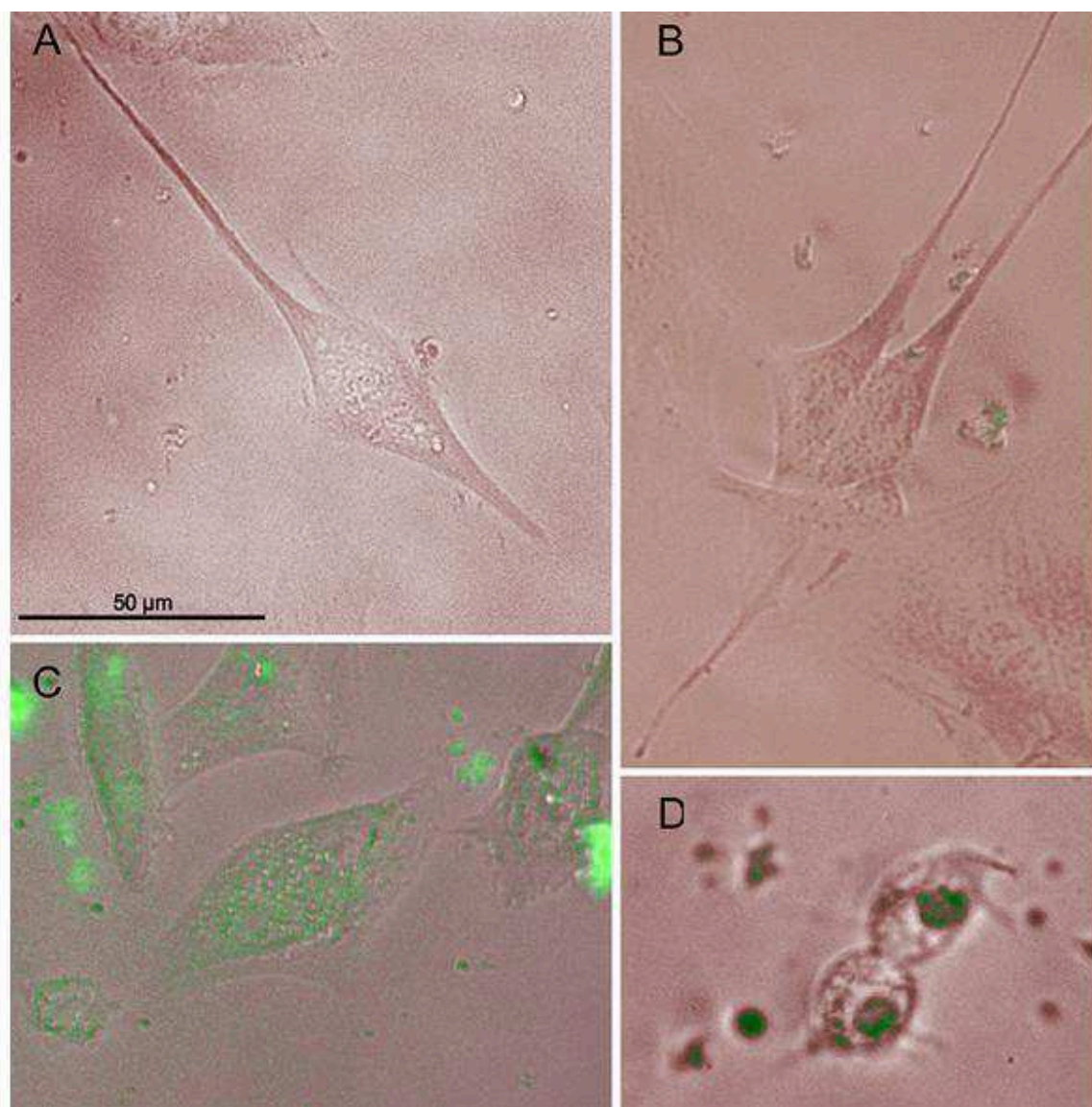


4.6. Rastreamento do bioconjugado MSPQs-BaltPLA₂

Os ensaios de rastreamento da BaltPLA₂ etiquetada com os MSPQs de CdSe/CdS foram realizados em cultura de mioblastos. A figura 12A mostra mioblastos com morfologia tipicamente alongada e processos citoplasmáticos evidentes. Após tratamentos das células com 200 ng/μL de MSPQs CdSe/CdS por 18 h pequenos aglomerados fluorescentes, indicando serem formados de MSPQs (Figura 12B). Por outro lado, quando os mioblastos foram incubados pelo mesmo tempo com o bioconjugado MSPQs-BaltPLA₂, várias marcações

fluorescentes na superfície da membrana plasmática foram observadas, indicando que a presença da BaltPLA₂ provocou a alteração da localização celular dos MSPQs de CdSe/CdS (Figura 12C). Nossos dados também mostraram marcações fluorescentes no núcleo dos mioblastos após 32h de tratamento com os MSPQs-BaltPLA₂ (Figura 12D), diferentemente daquelas células que foram incubadas apenas com o MSPQs.

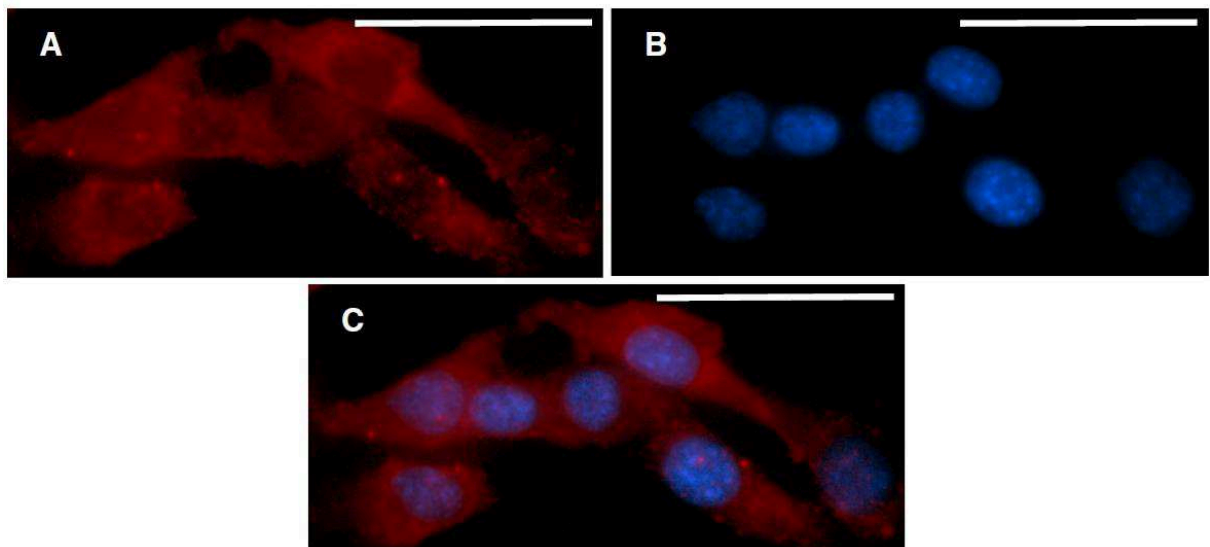
Figura 12. Imagens de microscopia de fluorescência evidenciando o rastreamento da BaltPLA₂ em cultura de mioblastos. (A) Controle celular (apenas mioblastos); (B) Mioblastos tratados com MSPQs (200 ng/μL) por 18h; (C) Mioblastos tratados com MSPQs (200 ng/μL)-BaltPLA₂ (100 ng/μL) por 18h; (D) Mioblastos tratados em telófase com MSPQs (200 ng/μL)-BaltPLA₂ (100 ng/μL) por 32h. Escala 50 μm.



4.7. Localização da BaltPLA₂ em mioblastos por imunofluorescência indireta

O teste de imunofluorescência indireta para a BaltPLA₂ foi realizado com o objetivo de comprovar a internalização da toxina em mioblastos. Nossos dados mostraram a BaltPLA₂ espalhada por toda a célula, incluindo na região nuclear (Figura 13).

Figura 13. Detecção da BaltPLA₂ em cultura de células após 24 h de incubação por imunofluorescência indireta. (A) imagem de imunofluorescência da BaltPLA₂, (B) coloração nuclear com DAPI, (C) sobreposição. Escala = 50 µm.



4.8. Ensaios antivirais

A fim de investigar outras atividades da BaltPLA₂, também foi avaliada sua ação antiviral sobre o vírus da dengue de sorotipo 2 (DENV2). Assim, utilizou-se método de redução da viabilidade celular e detecção de proteínas virais a partir dos métodos de MTT e imunofluorescência indireta, respectivamente. O CC₅₀ foi determinado após os testes de citotoxicidade da BaltPLA₂, o qual atingiu valores acima de 300 µg/mL (dados não mostrados). Dessa forma, consideramos este valor (300 µg/mL) para os cálculos do índice de seletividade e a atividade antiviral

foi investigada com concentrações não citotóxicas da toxina por meio dos ensaios virucida, pré e pós-tratamento, adsorção e internalização.

Com o propósito de avaliar o potencial da BaltPLA₂ de inativar a partícula viral, foi realizado o ensaio virucida. Houve uma diminuição de até 72% na citotoxicidade viral após tratamento do DENV2 com 100 µg/mL de BaltPLA₂ comparado ao controle sem tratamento (Figura 16). Quando as células foram tratadas com a BaltPLA₂ antes da infecção pelo vírus (pré-tratamento), não foi observada citotoxicidade causada pela infecção pelo DENV2 em níveis estatisticamente significativos (Figura 17). Por outro lado, a figura 18 mostra uma redução de mais de 50% da ação citotóxica do vírus no ensaio de pós-tratamento em todas as concentrações de BaltPLA₂ utilizadas (25, 50 e 100 µg/mL).

Figura 16. Ensaio virucida. A atividade virucida da BaltPLA₂ (25, 50 e 100 µg/mL) contra o DENV2 ($33,6 \pm 0,17$ TCID₅₀) foi determinada em células Vero. A citotoxicidade viral foi avaliada em relação ao controle sem tratamento com a toxina. O gráfico mostra as médias e desvios-padrão de cada tratamento, realizado em triplicatas. (*) Inibição significativa da citotoxicidade causada pelo vírus ($p < 0,05$).

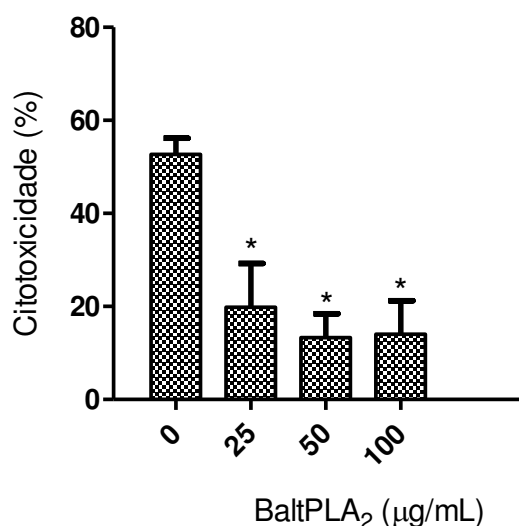


Figura 17. Ensaio de pré-tratamento. A atividade de pré-tratamento da BaltPLA₂ (25, 50 e 100 µg/mL) contra o DENV2 (33,6 ± 0,17 TCID₅₀) foi determinada em células Vero. A citotoxicidade viral foi avaliada em relação ao controle sem tratamento com a toxina. O gráfico mostra as médias e desvios-padrão de cada tratamento, realizado em triplicatas.

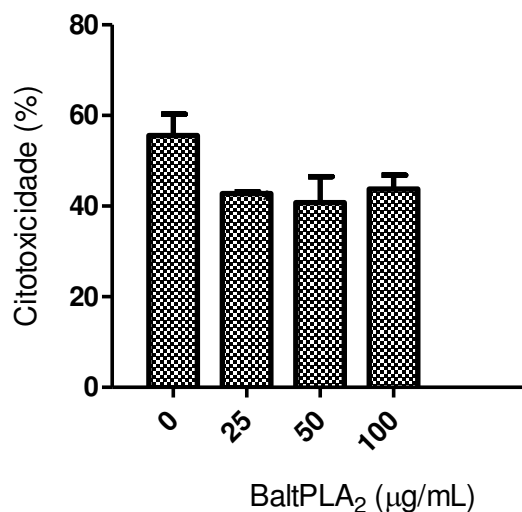


Figura 18. Ensaio de pós-tratamento. A atividade de pós-tratamento da BaltPLA₂ (25, 50 e 100 µg/mL) contra o DENV2 (33,6 ± 0,17 TCID₅₀) foi determinada em células Vero. A citotoxicidade viral foi avaliada em relação ao controle sem tratamento com a toxina. O gráfico mostra as médias de cada tratamento, realizado em triplicatas. (*) Inibição significativa da citotoxicidade causada pelo vírus ($p < 0,05$).

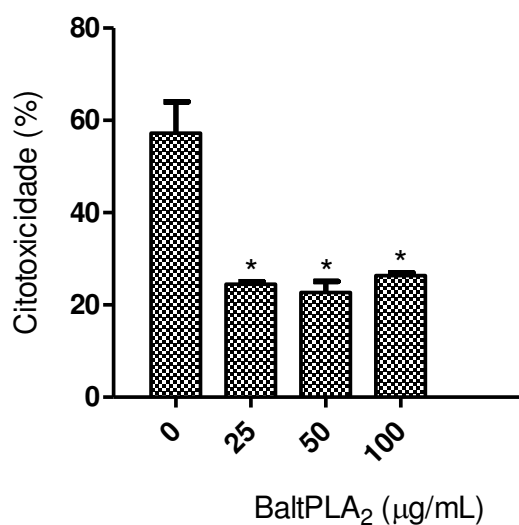


Tabela 2. Índice de seletividade dos ensaios antivirais.

Atividade antiviral	EC ₅₀ (µg/mL)	SI
Virucida	20,7	14,4
Pós-tratamento	24,5	12,2
Pré-tratamento	Sem atividade	Sem atividade
Adsorção	80,5	3,7
Internalização	Sem atividade	Sem atividade

A efetividade da BaltPLA₂ em reduzir citotoxicidade viral também foi observada no ensaio de adsorção mostrado na figura 19, com redução significativa de até 56% da mesma ($p < 0,05$). Entretanto, não foi observada diminuição de citotoxicidade viral no teste de internalização (Figura 20).

Figura 19. Ensaio de adsorção viral. A BaltPLA₂ (25, 50 e 100 µg/mL) foi incubada com o DENV2 ($33,6 \pm 0,17$ TCID₅₀) em células Vero. A citotoxicidade viral foi avaliada em relação ao controle sem tratamento com a toxina. O gráfico mostra as médias e desvios-padrão de cada tratamento, realizado em triplicatas. (*) Inibição significativa da citotoxicidade causada pelo vírus ($p < 0,05$).

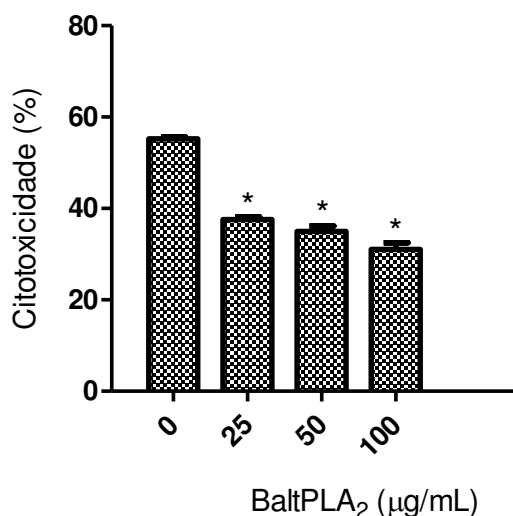
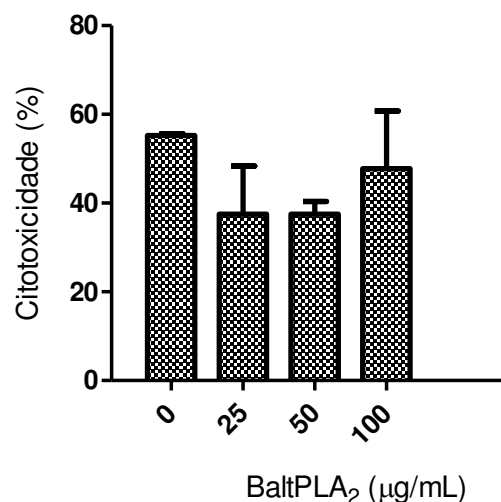
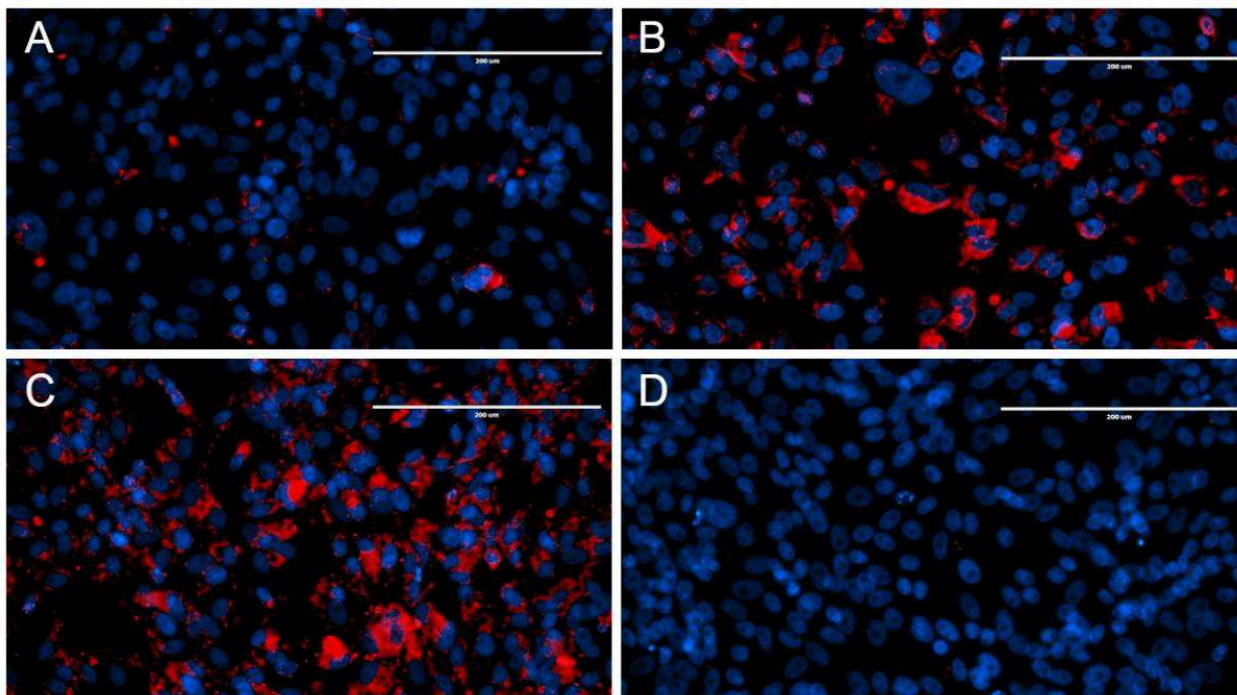


Figura 20. Ensaio de internalização viral. A atividade de pós-tratamento da BaltPLA₂ (25, 50 e 100 µg/mL) contra o DENV2 (33,6 ± 0,17 TCID₅₀) foi determinada em células Vero. A citotoxicidade viral foi avaliada em relação ao controle sem tratamento com a toxina. O gráfico mostra as médias e desvios-padrão de cada tratamento, realizado em triplicatas.



Na Tabela 2, observa-se que, no ensaio virucida, a toxina em questão é 14 vezes mais tóxica para o vírus do que para as células (IS=14,4), enquanto que no pós-tratamento ela foi cerca de 12 vezes (IS= 12,2). Ainda, a atividade da BaltPLA₂ também foi avaliada por meio de imunofluorescência indireta (IF), utilizando soro contra o DENV2 produzido em camundongos. A monocamada semiconfluente de células Vero foi incubada com o vírus na presença ou na ausência da toxina. A figura 21A mostra que houve redução considerável da quantidade de proteínas virais expressas no interior das células no ensaio virucida, assim como no pós-tratamento (Figura 21B).

Figura 21. Atividade antiviral da BaltPLA₂ por imunofluorescência indireta. (A) ensaio virucida; (B) ensaio de pós-tratamento; (C) controle viral (sem BaltPLA₂); (D) controle celular (sem vírus). As marcações em vermelho são referentes às proteínas virais e em azul os núcleos celulares.



5. DISCUSSÃO

As peçonhas de serpentes contêm uma grande variedade de toxinas que são responsáveis pelos efeitos fisiopatológicos do acidente ofídico. O estudo desses compostos e de seus danos teciduais/celulares é de extrema importância para auxiliar a medicina na busca de alternativas terapêuticas para os efeitos fisiopatológicos do ofidismo (HARRIS & SCOTT-DAVEY, 2013).

As svPLA₂ da peçonha de serpentes compreendem um grupo de proteínas que possuem um papel significativo no dano tecidual, o qual pode ser dependente ou não de sua atividade catalítica (GHAZARYAN et al., 2015). Dentre os efeitos decorrentes das svPLA₂ encontram-se a miotoxicidade, neurotoxicidade, citotoxicidade, alterações hemostáticas e indução de respostas inflamatórias

(DIAS et al., 2018; LEIGUEZ et al., 2018; MAMEDE et al., 2016; CARVALHO et al., 2014; KINI, 2005). Neste presente trabalho, temos a BaltPLA₂ como objeto de estudo. Essa toxina pertence ao grupo das svPLA₂ Asp-49 e sua atividade catalítica está ligada a efeitos mionecróticos *in vivo* e pró-inflamatórios em cultura de macrófagos. Apesar dos danos causados pela BaltPLA₂, a mesma apresentou ação anticoagulante e de inibição da agregação plaquetária (DIAS et al., 2018), fatos que reforçam o estudo do mecanismo de atuação e dos possíveis efeitos terapêuticos da toxina. Dessa forma, é necessário o desenvolvimento de novas metodologias eficazes, sensíveis e baratas para detectar, decifrar e monitorar a atividade não apenas da BaltPLA₂, como também de outras toxinas ofídicas.

Os corantes fluorescentes são bons exemplos de compostos eficientes para a detecção e monitoramento de biomoléculas, entretanto a fotossensibilidade e o alto custo de produção limita a utilização dos mesmos (OLIVEIRA et al., 2017). Dessa forma, as nanopartículas vêm ganhando destaque na geração de imagens fluorescentes em pesquisa científica. A alta estabilidade estrutural, a capacidade de excitação na presença de energia eletromagnética e consequente emissão de fluorescência atraem o interesse dos pesquisadores para o estudo de uma classe de nanopartículas chamadas de pontos quânticos (MARTYNENKO et al., 2017; GOTO et al., 2016; ZHUO et al., 2012; ROSENTHAL et al., 2011). A versatilidade dessas estruturas é dependente de fatores como composição, tamanho e funcionalização de suas superfícies de tal forma que podem ser moduladas de acordo com a aplicação (SILVA et al., 2018b).

As proteínas funcionalizadas com PQs já se tornaram uma realidade em estudos biológicos. HE e colaboradores (2013) desenvolveram PQs associados à lisozima, tripsina, albumina bovina e transferrina. Particularmente, o bioconjugado PQs-transferrina demonstrou aplicabilidade para marcação de células cancerosas. De forma semelhante, SUN e colaboradores (2018) criaram PQs conjugados com a proteína Ki-67 como biomarcador de câncer de mama. Em outro estudo, PQs foram utilizados para a rotulagem e rastreamento do Fator de Crescimento Nervoso (NGF), uma proteína responsável pela crescimento e sobrevivência de células neuronais, em cultura de neurônios ganglionares (CUI et al., 2007). Todas as pesquisas citadas acima comprovam a eficiência dos PQs no

desenvolvimento de sondas fluorescentes para rastrear e localizar proteínas em células.

Dentre os PQs, destacam-se os pontos quânticos de tamanhos mágicos, nanopartículas que apresentam um número limitado de átomos, diâmetro de 1 a 2 nm, amplo espectro de emissão e ainda são termodinamicamente estáveis comparados aos pontos quânticos tradicionais (SILVA et al., 2014; RIEHLE et al., 2009; XIA et al., 2008; JOSE et al., 2006). Visando essas características SILVA e colaboradores (2013) construíram os PQs de seleneto de cádmio/sulfeto de cádmio (CdSe/CdS) funcionalizados com 1-tioglicerol, os quais mostraram aplicabilidade comprovada na áreas biomédicas devido a sua baixa citotoxicidade (SILVA et al., 2014).

O sucesso da bioconjugação dos PQs está diretamente ligado às propriedades físico-químicas dos mesmos, como a estabilidade, a eficiência de emissão de fluorescência e a boa absorvidade molar, contribuindo para o biorreconhecimento e rastreamento de moléculas específicas nos meios extra e/ou intracelulares (SILVA et al., 2014; BERI et al., 2011; XIA & ZHU, 2008). Para esse propósito, os PQs necessitam atender alguns requisitos, como terem um bom desempenho na produção de sinais analíticos, alta solubilidade e estabilidade independente do meio em que serão usados, baixa citotoxicidade e apresentarem grupos funcionais para a rotulagem com biomoléculas (SILVA et al., 2014; RESCH-GENGER et al., 2008). Por atenderem a essas condições, os MSPQs de CdSe/CdS foram utilizados neste trabalho para a bioconjugação com a BaltPLA₂.

O presente trabalho teve como objetivo principal a criação de uma sonda fluorescente para o rastreamento em células *in vitro* da BaltPLA₂ a partir de MSPQs de CdSe/CdS. Para tal finalidade e caracterização das interações entre essa toxina e os MSPQs foram realizados testes de Espectroscopia de Infravermelho por Transmissão de Fourier (FT-IR), uma importante ferramenta para a realização de análises biológicas (BAKER et al., 2014). A FT-IR é uma técnica baseada na detecção dos modos vibracionais específicos das ligações químicas presentes nas moléculas após absorção de energia no espectro de infravermelho (STUART, 2004). O perfil vibracional de inúmeras biomoléculas já

foi caracterizado, tais como de proteínas, ácidos nucleicos, carboidratos e lipídeos, variando dentro da região $620\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$ (AGARWALA et al., 2014).

Nossas análises de FT-IR permitiram a elucidação das interações específicas entre os MSPQs e a BaltPLA₂. Várias bandas foram observadas na região de $850\text{-}1500\text{ cm}^{-1}$ (Figura 8), sendo aquelas entre $870\text{-}980\text{ cm}^{-1}$ características de modos vibracionais de ligações C-C, enquanto as bandas em 1046 , 1086 e 1421 cm^{-1} equivalem aos estiramentos C-OH de álcool primário, C-OH de álcool secundário e o modo vibracional de C-H, respectivamente (AGARWALA et al., 2014). Esses modos de vibração podem ser atribuídos aos grupos hidroxila externos do estabilizador 1-tioglicerol, que foi utilizado para a síntese e funcionalização dos MSPQs de CdSe/CdS. Curiosamente, o espectro do bioconjugado MSPQs-BaltPLA₂ mostrou perda de intensidade vibracional nas regiões de 877 , 1046 , 1086 e 1421 cm^{-1} comparado apenas ao perfil de vibração dos MSPQs de CdSe/CdS. Assim, nossos dados sugerem que a interação entre os MSPQs em questão e a BaltPLA₂ ocorre na região de grupos hidroxilas do 1-tioglicerol (Figura 7) e que essa interação é suficientemente forte para alterar a intensidade dos modos vibracionais das ligações C-C e C-H.

Ainda, os modos vibracionais observados em 2825 cm^{-1} da região A (Figura 8A) correspondem ao estiramento vibracional de ligações C-H, enquanto em 2910 cm^{-1} é atribuídos ao estiramento C-H₂ assimétrico (SILVA et al., 2014). Ao analisar o perfil vibracional do bioconjugado MSPQs-BaltPLA₂ foi possível observar a redução de intensidade da banda de 2910 cm^{-1} , indicando que a ligação entre os MSPQs e a toxina nessa região é suficiente para distorcer o modo vibracional do estiramento C-H₂ assimétrico da BaltPLA₂. Adicionalmente, as mudanças em 2910 cm^{-1} provavelmente estão relacionadas aos grupos de hidrocarbonetos alifáticos das fosfolipases A₂ botrópicas (CECCHINI et al., 2004). Com base nesses resultados, sugere-se que a formação do bioconjugado MSPQs-BaltPLA₂ ocorre espontaneamente através de interações dipolo-dipolo entre os grupos hidroxilas do 1-tioglicerol e os hidrocarbonetos alifáticos da BaltPLA₂.

O revestimento dos PQs com grupamentos químicos influencia diretamente a bioconjugação (WEGNER & HILDEBRANDT, 2015). O processo de funcionalização/estabilização é regido, principalmente, pela associação de

moléculas que contêm em suas estruturas grupos carboxílicos, aminas, tiol e hidroxilas à superfície dos PQs (ZHOU et al., 2017; PILLA et al., 2013). Além de interagir com as biomoléculas, estes grupos reduzem significativamente as ligações inespecíficas dos PQs em células em cultura e aumentam a solubilidade dos mesmos em meio aquoso (KAIRDOLF et al., 2008), fatos que estão em concordância com nossos resultados, em virtude da funcionalização dos MSPQs de CdSe/CdS com o 1-tioglicerol ter sido essencial para a bioconjugação destes pontos quânticos com a BaltPLA₂.

Outros dados de FT-IR mostraram que, aparentemente, a ligação entre os MSPQs e a BaltPLA₂ ocorre de forma específica, uma vez que a incubação dos MSPQs de CdSe/CdS com a BmooS, uma serino protease purificada da peçonha de *B. moojeni* (OLIVEIRA et al., 2016), não apresentou alterações (dados não mostrados). Após a formação do bioconjugado, também foi observado que não houve modificações conformacionais na estrutura da BaltPLA₂ (Figura 10), possivelmente, devido à quantidade de ligações dissulfeto presentes em sua molécula, garantindo a alta estabilidade das svPLA₂ (GHAZARYAN et al., 2015; ARNI et al., 1996).

A partir dos testes de cromatografia de fase reversa, foi possível verificar a composição do bioconjugado MSPQs-BaltPLA₂. Nossos resultados sugerem que a BaltPLA₂ pode se ligar a diferentes quantidades de MSPQs de CdSe/CdS. Após incubação da mesma com proporções crescentes de pontos quânticos observamos que a intensidade do pico de absorção da BaltPLA₂ diminuiu e foi deslocado para a esquerda do gráfico (Figura 9). Esses dados indicam que os MSPQs alteram o perfil de absorção de luz ultravioleta da BaltPLA₂ e as características hidrofóbicas da toxina. Baseado nessas observações foi escolhida a proporção 2:1 (massa/massa) do bioconjugado MSPQ-BaltPLA₂ para os ensaios de rastreabilidade *in vitro* dessa svPLA₂, visto que nessas condições a quantidade de BaltPLA₂ livre é mínima (Figura 9D). Testes revelaram que o pico de absorção da BaltPLA₂ desapareceu na proporção 4:1 (massa/massa) do bioconjugado MSPQs-BaltPLA₂, sugerindo saturação da toxina e excesso de MSPQs (dados não mostrados).

Adicionalmente, os testes de dicroísmo circular (Figura 10) e atividade hemolítica indireta do complexo MSPQs-BaltPLA₂ (Figura 11) revelaram que os

MSPQs não alteraram a atividade catalítica nem de maneira significativa a conformação nativa da BaltPLA₂, validando a utilização dos pontos quânticos de tamanhos mágicos para a bioconjugação e aplicação nas investigações biológicas. HUANG e colaboradores (2011) mostraram que os PQs constituídos de CdS são capazes de se ligar à proteínas como a albumina e a lisozima, entretanto a funcionalização das nanopartículas pode interferir de forma significativa na estrutura secundária dessas proteínas, o que parece não ocorrer com os MSPQs de CdSe/CdS funcionalizados com o 1-tioglicerol.

Em nosso trabalho, realizamos a detecção e o rastreamento da BaltPLA₂ em mioblastos. Os resultados mostraram que não houve interações entre os MSPQs de CdSe/CdS e a membrana plasmática dos mioblastos, nem mudanças conformacionais das células quando incubadas apenas com as nanopartículas (Figura 12B). Nessas condições foi observada uma pequena quantidade de luminescência em razão da dispersão dos MSPQs no meio de cultura em que as células estavam inseridas, fato atribuído à solubilidade dos PQs em meio aquoso. Entretanto, ao incubar as células com o bioconjugado MSPQs-BaltPLA₂ houve luminescência significativa na superfície da membrana plasmática dos mioblastos, que pode ser atribuída à alta afinidade das svPLA₂ pelos fosfolípidos de membrana (Figura 12C) (GUTIÉRREZ et al., 1988).

Ainda, após 32 h de incubação dos mioblastos com os MSPQ-BaltPLA₂, foi detectada fluorescência no núcleo, mostrando que o bioconjugado atravessou a membrana plasmática e migrou em direção ao núcleo. Interessantemente, foram encontradas marcações no núcleo de células no momento da telófase (Figura 12D), fase final da mitose. Além disso, nossos resultados de microscopia de fluorescência foram concordantes com os achados anteriores, uma vez que também foram observadas marcações da BaltPLA₂ no núcleo dos mioblastos (Figura 13C). De acordo com MURAKAMI e colaboradores (1999) as svPLA₂ podem penetrar em células e atingir alvos intracelulares, incluindo receptores de membrana e a área perinuclear. Outro estudo utilizou a microscopia confocal de varredura a laser para demonstrar que a PLA₂ marcada com Alexa tem a capacidade de adentrar ao citoplasma de neurônios hipocámpais de ratos e, subsequentemente, ao núcleo (PETROVIC et al., 2004). Em adição, RIGONI e colaboradores (2008) usou uma metodologia similar para mostrar que as svPLA₂

internalizam em neurônios motores da medula espinhal, em neurônios do cerebelo e em mitocôndrias. Esses achados corroboram a observação da presença da BaltPLA₂ na região nuclear e percebe-se que a utilização dos MSPQs de CdSe/CdS na rotulagem e rastreamento da BaltPLA₂ foi eficiente.

A aplicação dos PQs na detecção indireta de fosfolipases já foi descrita. LI e colaboradores (2016) desenvolveram um método simples para a identificação de fosfolipases A₂, no qual os pesquisadores encapsularam os PQs de CdSe/ZnS com micelas fosfolipídicas. Quando encapsuladas, essas nanopartículas emitem baixas fluorescências, porém, na presença de PLA₂ os fosfolipídios são degradados e os PQs liberados no meio, ocasionando a detecção da proteína por meio de sua atividade fosfolipásica. Testes semelhantes foram realizados por KETHINEEDI e colaboradores (2013), alterando apenas o revestimento dos PQs por lipossomos. Em ambos os estudos, a detecção da PLA₂ ocorre indiretamente, diferenciando-os dos nossos resultados em que apresentamos a detecção direta da BaltPLA₂ utilizando a bioconjugação espontânea da mesma com MSPQs de CdSe/CdS.

Atualmente, ainda são poucos os estudos de detecção e rastreamento de toxinas da peçonha de serpentes utilizando PQs. UTIKIN e colaboradores (2017) desenvolveram PQs de CdSe/ZnS acoplados com a α -cobratoxina, uma proteína isolada da peçonha da serpente *Naja kaouthia* com seletividade para receptores nicotínicos de acetilcolina em músculo e receptores neuronais $\alpha 7$. O processo de rotulagem da α -cobratoxina ocorreu via método de carbodiimida e os testes posteriores à bioconjugação mostraram que a toxina em questão manteve sua afinidade pelos receptores mesmo acoplada aos PQs, tornando-se possível rastrear e localizar esses receptores nos tecidos orgânicos. RODRIGUES (2017) desenvolveu uma sonda fluorescente baseada em uma PLA₂ da peçonha de *B. pauloensis* (BnSP-6) e os MSPQs de CdSe/CdS. Os dados de FT-IR corroboraram com os obtidos no nosso trabalho, uma vez que a interação dos MSPQs com a toxina ocorreu via grupos hidroxila destas nanopartículas. Ainda, esta sonda possibilitou o rastreamento da BnSP-6 em larvas infectantes de *Strongyloides venezuelensis*. Em contrapartida, a indução da bioconjugação da BnSP-6 com os MSPQs de CdSe/CdS e da α -cobratoxina com os PQs de CdSe/ZnS foi mediada por agentes químicos, o que diferencia da bioconjugação

da BaltPLA₂ com os MSPQs, ocorrida espontaneamente e sem nenhum tratamento prévio.

O estudo das svPLA₂ é importante para o entendimento de seus mecanismos de ação em células, tecidos e órgãos. Dessa forma, o desenvolvimento de sondas que possibilitam o rastreamento dessas toxinas torna-se de fundamental importância e contribuem para a compreensão de suas atividades biológicas. Por outro lado, entender as inúmeras ações das svPLA₂ incentiva pesquisas sobre o uso terapêutico dessas proteínas (ALMEIDA et al. 2016; BORGES et al. 2016; JRIDI et al. 2015;).

Dentre estas pesquisas, a capacidade das svPLA₂ de combater alguns vírus já foi descrita. Basicamente, a ação catalítica dessas enzimas sobre os fosfolipídeos é essencial para a alteração estrutural, principalmente, de vírus envelopados como o vírus da encefalite japonesa, o vírus da hepatite C e o vírus da dengue (CHEN et al., 2017; MULLER et al., 2012; CECILIO et al., 2013). Dessa forma, nosso trabalho também teve como objetivo verificar a atividade antiviral da BaltPLA₂ sobre o vírus da dengue.

Considerada a arbovirose mais prevalente no mundo, a dengue é encontrada principalmente nas regiões tropicais e subtropicais. Anualmente, milhões de pessoas são infectadas pelo vírus da dengue, tornando a doença um problema de saúde pública mundial (WHO, 2018;). Ainda que existam diferenças filogenéticas entre os quatro sorotipos virais (DENV1, DENV2, DENV3 e DENV4), os sintomas são semelhantes em humanos, compreendidos entre a Síndrome de Choque da Dengue, a febre hemorrágica e a febre clássica (SUN et al., 2018; KATZELNICK et al., 2015; ROTHMAN & MEDIN, 2013).

A partícula do vírus da dengue contém um diâmetro com cerca de 50 nm, capsídeo com simetria icosaédrica e é formada por um envelope lipídico associado a duas proteínas de membrana chamadas de E e M. Um capsídeo composto pela proteína C envolve o material genético de RNA fita simples (ssRNA) e polaridade positiva com aproximadamente 11 kb (BYK et al., 2016; KLEIN et al., 2013). Todos esses componentes apresentam funções específicas durante o processo de infecção e replicação viral (KHETARPAL & KHANNA, 2016).

O ciclo replicativo do DENV ocorre por meio da ligação (adsorção) das proteínas E a receptores celulares como proteoglicanos heparan sulfato, chaperonas HSP90 e HSP70, e claudinas-1, dentre outros (CRUZ-OLIVEIRA et al., 2015). Após esta etapa, o vírus é internalizado via endocitose mediada por receptores. Uma vez dentro da célula, há a fusão do envelope viral à bicamada lipídica da vesícula endossômica devido à ocorrência de mudanças estruturais da proteína E na presença de pH baixo nesse compartimento (FUZO et al., 2013; HARRISON, 2008), seguido de liberação do genoma no citoplasma. A tradução do ssRNA viral pela maquinaria celular produz uma poliproteína que é posteriormente clivada em três estruturais (E, C e M) e sete não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5) (LESCAR et al., 2018). O material genético do vírus é então replicado, as novas partículas virais imaturas são formadas na membrana do retículo endoplasmático e transferidas para o complexo de Golgi, onde ocorre a maturação e, em seguida, os novos vírus são secretados para o meio extracelular (DIAMOND; PIERSON, 2015; INOUE & TSAI, 2013; CLYDE et al., 2006).

No Brasil, desde 2010, a dengue integra o quadro de Doenças de Notificação Compulsória do Ministério da Saúde (BRASIL, 2010). Seu perfil epidemiológico reforça a necessidade de alternativas de prevenção e controle. Basicamente, uma das principais medidas preventivas contra a dengue é o controle do vetor, abrangendo atividades de visita domiciliar e ações de conscientização populacional, melhorias na coleta de resíduos sólidos, identificação de focos de larvas e utilização de inseticidas e larvicidas (BRASIL, 2009). Apesar desses esforços, boa parte da população ainda não está adequadamente sensibilizada contra a dengue (SOUZA et al., 2018; CARRARA et al., 2012; SOUZA 2012; CARVALHO et al., 2004).

Vários estudos têm se dedicado ao controle vetorial por alternativas genéticas e biológicas. Experimentos já comprovaram que depois de introduzida no mosquito do gênero *Aedes*, a bactéria intracelular *Wolbachia* tem a capacidade de reduzir a replicação viral dentro do vetor (KING et al., 2018; HUGO et al., 2014; HOFFMANN et al., 2011). O uso de mosquitos *Aedes* transgênicos contendo genes que, quando expressos, causam a morte da larva durante seu

desenvolvimento em adulto também pode ser uma ferramenta para o combate à dengue (ANDRADE et al., 2016; CARVALHO et al., 2015).

Recentemente, a vacinação contra a dengue foi aprovada para a prevenção da doença. Apesar de não proteger 100% das pessoas vacinadas, a Organização Mundial da Saúde ressalta a vacina Dengvaxia® (CYD-TDV) como o maior avanço no combate ao vírus da dengue, pois tem alta eficiência e previne contra os quatro sorotipos virais. Em um primeiro momento, ela foi indicada para pessoas que têm entre 9 e 45 anos de idade e que moravam em regiões endêmicas (WHO, 2017). Por outro lado, estudos recentes demonstraram que quando administrada em pacientes que nunca tiveram contato prévio com o vírus (soronegativos), a Dengvaxia® pode aumentar as chances de desenvolvimento da forma grave da doença quando estes adquirissem infecção pelo DENV, sendo indicada assim apenas para pessoas que já tiveram a doença (soropositivas) (BRASIL, 2018; WHO, 2018; HALSTEAD, 2017).

Ainda que existam alternativas no combate à dengue como o controle vetorial e a própria vacina Dengvaxia®, não há uma alternativa totalmente eficaz contra este vírus. Portanto, a busca por meios terapêuticos para a doença é de extrema importância, justificando nosso estudo. Em nossos ensaios antivirais, a BaltPLA₂ demonstrou inativar a partícula do DENV2 (ensaio virucida), ocasionando a redução de infecção das células em cultura pelo vírus. Alguns pesquisadores relataram que as fosfolipases isoladas de peçonhas de serpentes que apresentaram atividade antiviral, seja pela capacidade dessas toxinas de hidrolizar e alterar a estrutura dos fosfolipídeos do envelope viral ou conferindo proteção às células hospedeiras. KOHN e KLIBANSKY (1967) mostraram que svPLAs isoladas de três serpentes desestruturaram os fosfolipídeos do envelope do vírus Newcastle, abolindo a propriedade desse vírus de fundir células. Resultados semelhantes foram observados por MULLER e colaboradores (2012) ao descreverem a atividade antiviral de uma PLA₂ (PLA₂-CB) isolada de *Crotalus durissus terrificus* contra os vírus da dengue e febre amarela. Neste caso, os autores sugerem que a PLA₂-CB atua na clivagem dos glicerofosfolipídeos do envelope viral, ocasionando uma desestabilização da proteína E e consequente inativação da partícula viral (MULLER et al., 2014).

A membrana plasmática e os compartimentos intracelulares formadas por bicamadas fosfolipídicas variam em sua composição fosfolipídica (JACKSON et al., 2016). Esse fato altera a constituição dos envelopes virais, uma vez que esses são formados a partir do retículo endoplasmático (RE) ou da membrana plasmática (MP) (WELSCH et al., 2009; CHEN et al., 2008; WELSCH et al., 2007). Ao analisar o mecanismo de ação da isoforma CM-II de uma svPLA₂ isolada de *Naja mossambica mossambica* perante alguns vírus envelopados, CHEN e colaboradores (2017) evidenciaram que essa toxina possui capacidade de inativar alguns vírus da família *Flaviviridae*, incluindo o da dengue, cujos envelopes têm origem no RE, o mesmo não aconteceu aqueles vírus envelopados a partir da MP, como o vírus Sindbis, o vírus da influenza A, o vírus Sendai e o herpes vírus humano tipo 1. Portanto, a diversidade catalítica das svPLA₂ sob diferentes fosfolipídeos tem potencial terapêutico e também pode ajudar no estudo do locais de brotamento viral.

A diminuição da citotoxicidade viral observada no ensaio de pós-tratamento significa que a BaltPLA₂ internaliza nas células Vero e provavelmente atua em alguma etapa de replicação do DENV. Neste caso, nossos resultados sugerem que a BaltPLA₂ possa atuar na estrutura fosfolipídica do retículo endoplasmático e interferir na formação do envelope viral, uma vez que outras svPLA₂ apresentaram esta capacidade (CHEN et al., 2017). Assim, a diversidade catalítica das svPLA₂ sobre diferentes fosfolipídios tem potencial terapêutico (KINI, 2003).

Contudo, a propriedade da BaltPLA₂ de atuar na desestruturação de fosfolipídios de membrana pode não ser a única via responsável pela ação observada em nossos ensaios antivirais. Os dados mostraram que a BaltPLA₂ foi capaz de inibir a adsorção do DENV2 às células (Figura 19), uma vez que esta toxina não interagiu com as células hospedeiras a ponto de conferir proteção contra a infecção viral (Figura 17), e também atuou na etapa de replicação do vírus (Figura 18). Estudos realizados por MULLER e colaboradores (2012) mostraram que a BthTX-I, uma fosfolipase A₂ cataliticamente inativa isolada de *B. Jararacussu*, teve atividade antiviral contra o vírus da dengue e o vírus da febre amarela nos ensaios virucida, adsorção e internalização. Esses resultados sugerem que a atividade catalítica dessa classe de proteínas não é a única

responsável pela atividade antiviral. Similarmente, uma fosfolipase A₂ denominada BalV naturalmente inativa isolada de *B. asper* foi capaz de inibir a replicação do HIV-1 *in vitro* (FENARD et al., 1999). Portanto, o mecanismo de ação antiviral da BaltPLA₂ pode ajudar a desvendar a atuação dessa proteína sobre os fosfolípídeos das biomembranas e contribuir para o combate ao vírus da dengue no futuro.

Curiosamente, a diminuição da replicação viral no ensaio de pós-tratamento dá indícios de novas atuações da BaltPLA₂ no meio intracelular. SHIMIZU e colaboradores (2017) já demonstraram que a PLA2-CB isolada da peçonha de *Crotalus durissus terrificus* atua no interior de células infectadas com o HCV e intercala com o RNA deste vírus, reduzindo a produção de novas partículas virais. Dessa forma, nossos resultados subsidiam o surgimento de uma nova linha de pesquisa para avaliar o mecanismo intracelular de ação da BaltPLA₂ no ciclo replicativo do DEN2.

6. CONCLUSÃO

O presente trabalho descreve a bioconjugação espontânea entre os MSPQs de CdSe/CdS e a BatPLA₂ isolada da peçonha de *B. alternatus*, sendo possível rastrear-la em cultura *in vitro* de mioblastos após 18 e 33 h de incubação com o bioconjugado, fornecendo uma ferramenta útil na elucidação dos mecanismos de ação das svPLA₂.

Nossos dados complementares mostraram a atividade antiviral da BatPLA₂ contra o vírus da dengue. Neste caso, houve a diminuição de aproximadamente 72%, 50%, 56% da citotoxicidade causada pela infecção pelo DENV nos ensaios virucida, pós-tratamento e adsorção, respectivamente. Assim, os resultados demonstraram que esta proteína pode ser uma importante ferramenta para o desenvolvimento de alternativas terapêuticas no futuro.

7. REFERÊNCIAS

- ADADE, C. M. et al. Crovirin, a snake venom cysteine-rich secretory protein (CRISP) with promising activity against *Trypanosomes* and *Leishmania*. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 10, p.e3252, 2014. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003252>
- AGARWALA, U. C.; NIGAM, H. L.; AGRAWAL, S.. **Infrared spectroscopy of molecules**. Singapura: World Scientific Pub Co Inc, 2014. 288 p. <https://doi.org/10.1142/9174>
- AKEF, Hassan M.. Snake venom: kill and cure. **Toxin Reviews**, p.1-20, 2017. <https://doi.org/10.1080/15569543.2017.1399278>
- AKUBUGWO, E. I.. The role of calcium on the active site of snake Venom phospholipase A₂: Molecular dynamics simulations. **Computational Biology And Bioinformatics**, v. 4, n. 1, p.10-14, 2016. <https://doi.org/10.11648/j.cbb.20160401.12>
- ALMEIDA, J. R. et al. CoaTx-II, a new dimeric Lys49 phospholipase A₂ from *Crotalus oreganus abyssus* snake venom with bactericidal potential: Insights into its structure and biological roles. **Toxicon**, v. 120, p.147-158, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2016.08.007>
- AMOROS, M. et al. Synergistic effect of flavones and flavonols against herpes simplex virus type 1 in cell culture. Comparison with the antiviral activity of propolis. **Journal of Natural Products**, v. 55, n. 12, p. 1732-40, 1992. <https://doi.org/10.1021/np50090a003>
- ANDRADE, P. P. de et al. Use of transgenic *Aedes aegypti* in Brazil: risk perception and assessment. **Bulletin Of The World Health Organization**, v. 94, n. 10, p.766-771, 2016. <https://doi.org/10.2471/BLT.16.173377>
- ARAKI, S. et al. Induction of apoptosis by hemorrhagic snake venom in vascular endothelial cells. **Biochemical And Biophysical Research Communications**, v. 190, n. 1, p.148-153, 1993. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1993.1023>
- ARIAS, S. P. et al. Isolation and functional characterization of an acidic myotoxic phospholipase A₂ from colombian *Bothrops asper* venom. **Toxins**, v. 9, n. 11, p.342-356, 2017. <https://doi.org/10.3390/toxins9110342>
- ARNI, R. K; WARD, R. J. Phospholipase A₂-a structural review. **Toxicon**, v. 34, n. 8, p.827-841, 1996. [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(96\)00036-0](https://doi.org/10.1016/0041-0101(96)00036-0)
- BAKER, M. J et al. Using Fourier transform IR spectroscopy to analyze biological materials. **Nature Protocols**, v. 9, n. 8, p.1771-1791, 2014. <https://doi.org/10.1038/nprot.2014.110>
- BALDO, C. et al. Mechanisms of Vascular Damage by Hemorrhagic Snake Venom Metalloproteinases: Tissue Distribution and In Situ Hydrolysis. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 4, n. 6, p.e727, 2010. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000727>

BALSINDE, J.; WINSTEAD, M. V; A DENNIS, E.. Phospholipase A₂ regulation of arachidonic acid mobilization. **FEBS Letters**, v. 531, n. 1, p.2-6, 2002. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(02\)03413-0](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(02)03413-0)

BAO, Y. et al. Purification, characterization and gene cloning of a novel phospholipase A₂ from the venom of *Agkistrodon blomhoffii ussurensis*. **The International Journal Of Biochemistry & Cell Biology**, v. 37, n. 3, p.558-565, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2004.05.022>

BELL, D. R. et al. Concentration-dependent binding of CdSe quantum dots on the SH3 domain. **Nanoscale**, v. 10, n. 1, p.351-358, 2018. <https://doi.org/10.1039/C7NR06148J>

BANERJEE, A. et al. Quantum dots-DNA bioconjugates: synthesis to applications. **Interface Focus**, v. 6, n. 6, p.20160064, 2016. <https://doi.org/10.1098/rsfs.2016.0064>

BERGER, M.; PINTO, A. F.M.; GUIMARÃES, J. A.. Purification and functional characterization of bothrojaractivase, a prothrombin-activating metalloproteinase isolated from *Bothrops jararaca* snake venom. **Toxicon**, v. 51, n. 4, p.488-501, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2007.09.005>

BERGH, C. J. van den et al. The role of Asp-49 and other conserved amino acids in phospholipases A₂ and their importance for enzymatic activity. **Journal Of Cellular Biochemistry**, v. 39, n. 4, p.379-390, 1989. <https://doi.org/10.1002/jcb.240390404>

BERI, R. K. et al. -Yellow emitting magic-size cadmium selenide nanocrystals via a simplified spray pyrolysis method. **Current Applied Physics**, v. 11, n. 3, p.809-811, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.cap.2010.11.072>

BERLIER, J. E. et al. Quantitative comparison of long-wavelength Alexa Fluor dyes to Cy dyes: fluorescence of the dyes and their bioconjugates. **Journal Of Histochemistry & Cytochemistry**, v. 51, n. 12, p.1699-1712, 2003. <https://doi.org/10.1177/002215540305101214>

BERNARDES, C. P. et al. Evaluation of the local inflammatory events induced by BpirMP, a metalloproteinase from *Bothrops pirajai* venom. **Molecular Immunology**, v. 68, n. 2, p.456-464, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2015.09.023>

BIEBER, A. L.. **Metal and nonprotein constituents in snake venoms**. In: LEE, Chen-yuan et al. **Snake venoms**. Berlin: Springer, 1979. Cap. 9. p. 295-304. https://doi.org/10.1007/978-3-642-66913-2_9

BIJU, V. et al. Semiconductor quantum dots and metal nanoparticles: syntheses, optical properties, and biological applications. **Analytical And Bioanalytical Chemistry**, v. 391, n. 7, p.2469-2495, 2008. <https://doi.org/10.1007/s00216-008-2185-7>

BORGES, I. P. et al. Anti-parasitic effect on *Toxoplasma gondii* induced by BnSP-7, a Lys49-phospholipase A₂ homologue from *Bothrops pauloensis* venom. **Toxicon**, v. 119, p.84-91, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2016.05.010>

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, n. 1-2, p.248-254, 1976. <https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999>

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Vacina dengue: esclarecimentos**. 2018. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/noticias//asset_publisher/FXrpx9qY7FbU/content/vacina-dengue-esclarecimentos/219201>. Acesso em: 2 fev. 2019.

BRASIL. **Acidentes por animais peçonhentos - Serpentes**. 2017. Disponível em: <<http://portalms.saude.gov.br/saude-de-a-z/acidentes-por-animais-peconhentos-serpentes>>. Acesso em: 10 out. 2018.

BRASIL. Portaria nº 2.472, de 31 de agosto de 2010. Define as terminologias adotadas em legislação nacional, conforme disposto no Regulamento Sanitário Internacional 2005 (RSI 2005), a relação de doenças, agravos e eventos em saúde pública de notificação compulsória em todo o território nacional e estabelecer fluxo, critérios, responsabilidades e atribuições aos profissionais e serviços de saúde. Brasília , DF.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Diretrizes nacionais para prevenção e controle de epidemias de dengue. Brasília, 2009. 160p.

BURKE, J. E.; DENNIS, E. A.. Phospholipase A₂ structure/function, mechanism, and signaling. **Journal Of Lipid Research**, v. 50, p.237-242, 2008. <https://doi.org/10.1194/jlr.R800033-JLR200>

BUSTILLO, S. et al. Phospholipase A₂ enhances the endothelial cell detachment effect of a snake venom metalloproteinase in the absence of catalysis. **Chemico-biological Interactions**, v. 240, p.30-36, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2015.08.002>

BYK, L. A.; GAMARNIK, A. V.. Properties and functions of the dengue virus capsid protein. **Annual Review Of Virology**, v. 3, n. 1, p.263-281, 2016. <https://doi.org/10.1146/annurev-virology-110615-042334>

CACCIALI, P.; SCOTT, N. J.; ORTÍZ, A. L. A.; FITZGERALD, L. A.; SMITH, P. The Reptiles of Paraguay: Literature, distribution and an annotated taxonomic checklist. **Special publication of the Museum of Southwestern Biology**, v. 11: p.1-373, 2016.

CAMPBELL, J. A.; LAMAR, W. W.. **The Venomous Reptiles of the Western Hemisphere**. Ithaca: Comstock Publishing Associates, 2004. 1032 p.

CANONNE, J.; FROIDURE-NICOLAS, S.; RIVAS, S.. Phospholipases in action during plant defense signaling. **Plant Signaling & Behavior**, v. 6, n. 1, p.13-18, 2011. <https://doi.org/10.4161/psb.6.1.14037>

CARLQUIST, J. F.; MUHLESTEIN, J. B.; ANDERSON, J. L.. Lipoprotein-associated phospholipase A₂: a new biomarker for cardiovascular risk assessment and potential therapeutic target. **Expert Review Of Molecular Diagnostics**, v. 7, n. 5, p.511-517, 2007. <https://doi.org/10.1586/14737159.7.5.511>

CARRARA, J. A.; TANAKA, E. Z.; BONALDO, C. D. Conhecimento da população em relação ao contágio, profilaxia e prevenção da dengue em Bauru-SP. **Ensaio e Ciência: Ciências Biológicas, Agrárias e da Saúde**, v. 16, n. 4, p.101-109, 2012.

CARVALHO, D. O. et al. Suppression of a field population of *Aedes aegypti* in Brazil by sustained release of transgenic male mosquitoes. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 7, p.e0003864, 2015. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003864>

CARVALHO, N. D. de et al. Neurotoxicity of coral snake phospholipases A₂ in cultured rat hippocampal neurons. **Brain Research**, v. 1552, p.1-16, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2014.01.008>

CARVALHO, M. A. de et al. Conhecimento da população sobre transmissão e medidas de prevenção para dengue e febre amarela. **Revista Médica de Minas Gerais**, v. 14, n. 1, p.8-12, 2004.

CASAI-SILVA, L. L. et al. Lemnitoxin, the major component of *Micrurus lemniscatus* coral snake venom, is a myotoxic and pro-inflammatory phospholipase A₂. **Toxicology Letters**, v. 257, p.60-71, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2016.06.005>

CASTILLO, J. et al. In vitro antiplasmodial activity of phospholipases A₂ and a phospholipase homologue isolated from the venom of the snake *Bothrops asper*. **Toxins**, v. 4, n. 12, p.1500-1516, 2012. <https://doi.org/10.3390/toxins4121500>

CECCHINI, A. L. et al. Effect of crotopotin on the biological activity of Asp49 and Lys49 phospholipases A₂ from *Bothrops* snake venoms. **Comparative Biochemistry And Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 138, n. 4, p.429-436, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2004.07.010>

CECILIO, A. et al. Molecular characterization of Lys49 and Asp49 phospholipases A₂ from snake venom and their antiviral activities against dengue virus. **Toxins**, v. 5, n. 10, p.1780-1798, 2013. <https://doi.org/10.3390/toxins5101780>

CHEN, B. J.; LAMB, R. A.. Mechanisms for enveloped virus budding: Can some viruses do without an ESCRT?. **Virology**, v. 372, n. 2, p.221-232, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2007.11.008>

CHEN, M. et al. Broad-spectrum antiviral agents: secreted phospholipase A₂ targets viral envelope lipid bilayers derived from the endoplasmic reticulum membrane. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p.15931, 2017. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-16130-w>

CHEN, X. et al. Investigation of the crystallization process in 2 nm CdSe quantum dots. **Journal Of The American Chemical Society**, v. 127, n. 12, p.4372-4375, 2005. <https://doi.org/10.1021/ja0458219>

CHIPPAUX, J-P.; WILLIAMS, V. K.; WHITE, J. Snake venom variability: methods of study, results and interpretation. **Toxicon**, v. 29, n. 11, p.1279-1303, 1991. [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(91\)90116-9](https://doi.org/10.1016/0041-0101(91)90116-9)

CHIPPAUX, J-P. Incidence and mortality due to snakebite in the Americas. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 6, p.e0005662, 2017. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005662>

CLYDE, K.; KYLE, J. L.; HARRIS, E.. Recent advances in deciphering viral and host determinants of dengue virus replication and pathogenesis. **Journal Of Virology**, v. 80, n. 23, p.11418-11431, 2006. <https://doi.org/10.1128/JVI.01257-06>

COLA, V. di; CHIARAVIGLIO, M.. Establishing species environmental requirements to understand how the southernmost species of South American pitvipers (*Bothrops*, *Viperidae*) are distributed: A niche-based modelling approach. **Austral Ecology**, v. 36, n. 1, p.90-98, 2011. <https://doi.org/10.1111/j.1442-9993.2010.02123.x>

CONLON, J. M. et al. Cytotoxic activities of [Ser49]phospholipase A₂ from the venom of the saw-scaled vipers *Echis ocellatus*, *Echis pyramidum leakeyi*, *Echis carinatus sochureki*, and *Echis coloratus*. **Toxicon**, v. 71, p.96-104, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2013.05.017>

CRUZ-OLIVEIRA, C. et al. Receptors and routes of dengue virus entry into the host cells. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 39, n. 2, p.155-170, 2015. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuu004>

CUI, B. et al. One at a time, live tracking of NGF axonal transport using quantum dots. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, v. 104, n. 34, p.13666-13671, 2007. <https://doi.org/10.1073/pnas.0706192104>

CUNHA, E. M.; MARTINS, O. A. Principais compostos químicos presente nos venenos de cobras dos gêneros *Bothrops* e *Crotalus* - uma revisão. **Revista Eletrônica de Educação e Ciência**, v. 2, n. 2, p. 21-26, 2012.

CUSHMAN, D. W. et al. Design of potent competitive inhibitors of angiotensin-converting enzyme. Carboxyalkanoyl and mercaptoalkanoyl amino acids. **Biochemistry**, v. 16, n. 25, p.5484-5491, 1977. <https://doi.org/10.1021/bi00644a014>

DANTAS, N. O. et al. Atomic and Magnetic Force Microscopy of Semiconductor and Semimagnetic Nanocrystals Grown in Colloidal Solutions and Glass Matrices. In: TANAKA, A.; NAKAMURA, B.. **Optical Imaging: Technology, Methods and Applications**. Hauppauge: Nova Science Publishers, 2012. p. 109-132.

DAVOLI-FERREIRA, M. et al. Nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 2 prompts potent inflammatory stimuli during *Neospora caninum* infection. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p.1-14, 2016. <https://doi.org/10.1038/srep29289>

DELAFONTAINE, M. et al. Enzymatic and Pro-Inflammatory Activities of *Bothrops lanceolatus* Venom: Relevance for Envenomation. **Toxins**, v. 9, n. 8, p.244-262, 2017. <https://doi.org/10.3390/toxins9080244>

DENNIS, E. A. et al. Phospholipase A₂ enzymes: physical structure, biological function, disease implication, chemical inhibition, and therapeutic intervention. **Chemical Reviews**, v. 111, n. 10, p.6130-6185, 2011. <https://doi.org/10.1021/cr200085w>

DIAMOND, M. s.; PIERSON, T. c.. Molecular insight into dengue virus pathogenesis and its implications for disease control. **Cell**, v. 162, n. 3, p.488-492, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.07.005>

DIAS, E. H. V. et al. BaltPLA₂: A new phospholipase A₂ from *Bothrops alternatus* snake venom with antiplatelet aggregation activity. **Protein & Peptide Letters**, v. 25, n. 10, p.943-952, 2018. <https://doi.org/10.2174/0929866525666181004101622>

DÍAZ, C. et al. Characterization of events associated with apoptosis/anoikis induced by snake venom metalloproteinase BaP1 on human endothelial cells. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 94, p.520-528, 2005. <https://doi.org/10.1002/jcb.20322>

DJORDJEVIC, J. T.. Role of Phospholipases in Fungal Fitness, Pathogenicity, and Drug Development - Lessons from *Cryptococcus neoformans*. **Frontiers In Microbiology**, v. 1, p.1-13, 2010. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2010.00125>

DVOYAN, K. G. et al. Electronic states and light absorption in quantum dot molecule. **Applied Physics Letters**, v. 98, n. 20, p.203109, 2011. <https://doi.org/10.1063/1.3592258>

EKIMOV, A. I.; ONUSHCHENKO, A. A.. Quantum size effect in three-dimensional microscopic semiconductor crystals. **Journal of Experimental and Theoretical Physics Letters**, v. 34, p.345, 1981.

FATIMA, L-D.; FATAH, C.. Pathophysiological and Pharmacological Effects of Snake Venom Components. **Molecular Targets**, v. 4, n. 2, 2014.

FEITOSA, E. S. et al. Snakebites as a largely neglected problem in the Brazilian Amazon: highlights of the epidemiological trends in the State of Amazonas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 48, n. 1, p.34-41, 2015.

FENARD, D. et al. Secreted phospholipases A₂, a new class of HIV inhibitors that block virus entry into host cells. **Journal of Clinical Investigation**, v. 104, n. 5, p.611-618, 1999. <https://doi.org/10.1172/JCI6915>

FENECH, M. The micronucleus assay determination of chromosomal Level DNA damage. **Environmental Genomics**, v. 410, p.185-216, 2008. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-548-0_12

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, n. 5, p.549-559, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2006.01.009>

FERNÁNDEZ, J. et al. Muscle phospholipid hydrolysis by *Bothrops asper* Asp49 and Lys49 phospholipase A₂ myotoxins - distinct mechanisms of action. **FEBS Journal**, v. 280, n. 16, p.3878-3886, 2013. <https://doi.org/10.1111/febs.12386>

FERREIRA, Bruno L. et al. Comparative Analysis of Viperidae venoms antibacterial profile: a short communication for proteomics. **Evidence-based Complementary And Alternative Medicine**, v. 2011, p.1-4, 2011. <https://doi.org/10.1093/ecam/nen052>

FERREIRA, S. H.; BARTELT, D. C.; GREENE, L. J.. Isolation of bradykinin-potentiating peptides from *Bothrops jararaca* venom. **Biochemistry**, v. 9, n. 13, p.2583-2593, 1970. <https://doi.org/10.1021/bi00815a005>

FLEER, E. A. M.; VERHEIJ, H. M.; HAAS, G. H. Modification of carboxylate groups in bovine pancreatic phospholipase A₂. Identification of aspartate-49 as Ca²⁺-binding ligand. **European Journal of Biochemistry**, v. 113, p.283-288, 1981. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1981.tb05064.x>

FRANCIS, J. E; MASON, D.; LÉVY, R.. Evaluation of quantum dot conjugated antibodies for immunofluorescent labelling of cellular targets. **Beilstein Journal Of Nanotechnology**, v. 8, p.1238-1249, 2017. <https://doi.org/10.3762/bjnano.8.125>

FUZO, C. A.; DEGRÈVE, L.. The pH dependence of flavivirus envelope protein structure: insights from molecular dynamics simulations. **Journal Of Biomolecular Structure And Dynamics**, v. 32, n. 10, p.1563-1574, 2013. <https://doi.org/10.1080/07391102.2013.827132>

GALBIATTI, C. et al. Pharmacological and partial biochemical characterization of Bmaj-9 isolated from *Bothrops marajoensis* snake venom. **The Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 18, n. 1, p.62-72, 2012.

GHAZARYAN, N. A. et al. Phospholipases A₂ from Viperidae snakes: Differences in membranotropic activity between enzymatically active toxin and its inactive isoforms. **Biochimica Et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v. 1848, n. 2, p.463-468, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2014.10.037>

GLUKHOVA, A. et al. Structure and function of lysosomal phospholipase A₂ and lecithin: cholesterol acyltransferase. **Nature Communications**, v. 6, n. 1, p.6250, 2015. <https://doi.org/10.1038/ncomms7250>

GOTO, T. E. et al. CdSe magic-sized quantum dots incorporated in biomembrane models at the air-water interface composed of components of tumorigenic and non-tumorigenic cells. **Biochimica Et Biophysica Acta (bba) - Biomembranes**, v. 1858, n. 7, p.1533-1540, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2016.04.009>

GUTIÉRREZ, J. M.; ESCALANTE, T.; RUCAVADO, A. Experimental pathophysiology of systemic alterations induced by *Bothrops asper* snake venom. **Toxicon**, v. 54, n. 7, p.976-987, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2009.01.039>

GUTIÉRREZ, J. et al. Hemorrhage caused by snake venom metalloproteinases: a journey of discovery and understanding. **Toxins**, v. 8, n. 4, p.93-111, 2016. <https://doi.org/10.3390/toxins8040093>

GUTIÉRREZ, J. M. et al. Hemorrhage induced by snake venom metalloproteinases: biochemical and biophysical mechanisms involved in microvessel damage. **Toxicon**, v. 45, n. 8, p.997-1011, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2005.02.029>

GUTIÉRREZ, J. M.; THEAKSTON, R. D. G; WARRELL, D. A. Confronting the Neglected Problem of Snake Bite Envenoming: The Need for a Global Partnership. **Plos Medicine**, v. 3, n. 6, p.e150, 2006. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.0030150>

GUTIÉRREZ, J. M. et al. An alternative in vitro method for testing the potency of the polyvalent antivenom produced in Costa Rica. **Toxicon**, v. 26, n. 4, p.411-413, 1988. [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(88\)90010-4](https://doi.org/10.1016/0041-0101(88)90010-4)

HABERMANN, E.; HARDT, K. L.. A sensitive and specific plate test for the quantification of phospholipases. **Analytical Biochemistry**, v. 50, p.163-173, 1972. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(72\)90495-2](https://doi.org/10.1016/0003-2697(72)90495-2)

HALSTEAD, S. B.. Dengvaxia sensitizes seronegatives to vaccine enhanced disease regardless of age. **Vaccine**, v. 35, n. 47, p.6355-6358, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2017.09.089>

HARRELL, S. M.; MCBRIDE, J. R.; ROSENTHAL, S. J.. Synthesis of ultrasmall and magic-sized CdSe nanocrystals. **Chemistry Of Materials**, v. 25, n. 8, p.1199-1210, 2013. <https://doi.org/10.1021/cm303318f>

HARRIS, J.; SCOTT-DAVEY, T.. Secreted phospholipases A₂ of snake venoms: effects on the peripheral neuromuscular system with comments on the role of phospholipases A₂ in disorders of the CNS and their uses in industry. **Toxins**, v. 5, n. 12, p.2533-2571, 2013. <https://doi.org/10.3390/toxins5122533>

HARRISON, S. C. Viral membrane fusion. **Nature Structural & Molecular Biology**, v. 15, n. 7, p.690-698, 2008. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1456>

HASSAN, M. S. et al. The influence of synthesis method on size and toxicity of CeO₂ quantum dots: Potential in the environmental remediation. **Ceramics International**, v. 42, n. 1, p.576-582, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2015.08.149>

HE, X.; GAO, L.; MA, N.. One-step instant synthesis of protein-conjugated quantum dots at room temperature. **Scientific Reports**, v. 3, n. 1, p.2825, 2013. <https://doi.org/10.1038/srep02825>

HERRERA, C. et al. Systemic effects induced by the venom of the snake *Bothrops caribbaeus* in a murine model. **Toxicon**, v. 63, p.19-31, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2012.10.023>

HOCKING, H. G.; ZANGGER, K.; MADL, T.. Studying the structure and dynamics of biomolecules by using soluble paramagnetic probes. **Chemphyschem**, v. 14, n. 13, p.3082-3094, 2013. <https://doi.org/10.1002/cphc.201300219>

HOFFMANN, A. A. et al. Successful establishment of Wolbachia in Aedes populations to suppress dengue transmission. **Nature**, v. 476, n. 7361, p.454-457, 2011. <https://doi.org/10.1038/nature10356>

HUANG, D. et al. Biomimetic interactions of proteins with functionalized cadmium sulfide quantum dots. **Colloids And Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 392, n. 1, p.191-197, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2011.09.054>

HUANG, Q. et al. Phylogenetic and structural analysis of the phospholipase A₂ gene family in vertebrates. **International Journal Of Molecular Medicine**, v. 35, n. 3, p.587-596, 2014. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2014.2047>

HUGO, L. E. et al. Adult Survivorship of the dengue mosquito *Aedes aegypti* varies seasonally in central Vietnam. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 2, p.e2669, 2014. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002669>

IIKAWA, F. et al. Optical Properties of Type-I and II Quantum Dots. **Brazilian Journal of Physics**, v. 34, n. 2B, 2004. <https://doi.org/10.1590/S0103-97332004000400004>

INOUE, T.; TSAI, B.. How Viruses Use the Endoplasmic Reticulum for Entry, Replication, and Assembly. **Cold Spring Harbor Perspectives In Biology**, v. 5, n. 1, p.a013250, 2013. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a013250>

ISTIVAN, T. S.; COLOE, P. J.. Phospholipase A in Gram-negative bacteria and its role in pathogenesis. **Microbiology**, v. 152, n. 5, p.1263-1274, 2006. <https://doi.org/10.1099/mic.0.28609-0>

IYER, A.; CHANDRA, A.; SWAMINATHAN, R.. Hydrolytic enzymes conjugated to quantum dots mostly retain whole catalytic activity. **Biochimica Et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 1840, n. 9, p.2935-2943, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2014.06.003>

IZIDORO, L. F. et al. Biochemical and functional characterization of an L-amino acid oxidase isolated from Bothrops pirajai snake venom. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 14, n. 20, p.7034-7043, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2006.06.025>

JACKSON, C. I.; WALCH, L.; VERBAVATZ, J-M. Lipids and their trafficking: an integral part of cellular organization. **Developmental Cell**, v. 39, n. 2, p.139-153, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2016.09.030>

JRIDI, I. et al. Hemilipin, a novel *Hemiscorpius lepturus* venom heterodimeric phospholipase A₂, which inhibits angiogenesis in vitro and in vivo. **Toxicon**, v. 105, p.34-44, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2015.08.022>

JONGES, M. et al. Influenza Virus Inactivation for Studies of Antigenicity and Phenotypic Neuraminidase Inhibitor Resistance Profiling. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, p. 928-940, 2010. <https://doi.org/10.1128/JCM.02045-09>

JOSE, R. et al. Structure–property correlation of CdSe clusters using experimental results and first-principles DFT calculations. **Journal Of The American Chemical Society**, v. 128, n. 2, p.629-636, 2006. <https://doi.org/10.1021/ja0565018>

JUREK, K. et al. New fluorescence probes for biomolecules. **Molecules**, v. 20, n. 7, p.13071-13079, 2015. <https://doi.org/10.3390/molecules200713071>

KAIRDOLF, B. A. et al. Minimizing nonspecific cellular binding of quantum dots with hydroxyl-derivatized surface coatings. **Analytical Chemistry**, v. 80, n. 8, p.3029-3034, 2008. <https://doi.org/10.1021/ac800068q>

KARAKOTI, A. S. et al. Surface functionalization of quantum dots for biological applications. **Advances In Colloid And Interface Science**, v. 215, p.28-45, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2014.11.004>

KASTURIRATNE, A. et al. The Global Burden of Snakebite: A Literature Analysis and Modelling Based on Regional Estimates of Envenoming and Deaths. **Plos Medicine**, v. 5, n. 11, p.e218, 2008. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.0050218>

KATZELNICK, L. C. et al. Dengue viruses cluster antigenically but not as discrete serotypes. **Science**, v. 349, n. 6254, p.1338-1343, 2015. <https://doi.org/10.1126/science.aac5017>

KETHINEEDI, V. R. et al. Quantum dot-NBD-liposome luminescent probes for monitoring phospholipase A₂ activity. **Analytical And Bioanalytical Chemistry**, v. 405, n. 30, p.9729-9737, 2013. <https://doi.org/10.1007/s00216-013-7422-z>

KHETARPAL, N.; KHANNA, I.. Dengue fever: causes, complications, and vaccine strategies. **Journal Of Immunology Research**, v. 2016, p.1-14, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/6803098>

KING, J. G. et al. Variation in Wolbachia effects on *Aedes* mosquitoes as a determinant of invasiveness and vectorial capacity. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, p.1483, 2018. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03981-8>

KINI, R.; KOH, C. Metalloproteases affecting blood coagulation, fibrinolysis and platelet aggregation from snake venoms: Definition and nomenclature of interaction sites. **Toxins**, v. 8, n. 10, p.284-310, 2016. <https://doi.org/10.3390/toxins8100284>

KINI, R. M. Structure-function relationships and mechanism of anticoagulant phospholipase A₂ enzymes from snake venoms. **Toxicon**, v. 45, n. 8, p.1147-1161, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2005.02.018>

KINI, R. M. Excitement ahead: structure, function and mechanism of snake venom phospholipase A₂ enzymes. **Toxicon**, v. 42, n. 8, p.827-840, 2003. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2003.11.002>

KLEIN, D. E.; CHOI, J. L.; HARRISON, S. C.. Structure of a dengue virus envelope protein late-stage fusion intermediate. **Journal Of Virology**, v. 87, n. 4, p.2287-2293, 2012. <https://doi.org/10.1128/JVI.02957-12>

KOHN, A.; KLIBANSKY, C.. Studies on the inactivation of cell-fusing property of newcastle disease virus by phospholipase A. **Virology**, v. 31, n. 2, p.385-388, 1967. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(67\)90183-3](https://doi.org/10.1016/0042-6822(67)90183-3)

KOSHMAN, Y. E. et al. Delivery and visualization of proteins conjugated to quantum dots in cardiac myocytes. **Journal Of Molecular And Cellular Cardiology**, v. 45, n. 6, p.853-856, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2008.08.006>

KOVTUN, O. et al. Single quantum dot tracking illuminates neuroscience at the nanoscale. **Chemical Physics Letters**, v. 706, p.741-752, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.cplett.2018.06.019>

KUMARI, A.; SINGH, R. R.. Encapsulation of highly confined CdSe quantum dots for defect free luminescence and improved stability. **Physica E: Low-dimensional Systems and Nanostructures**, v. 89, p.77-85, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.physe.2017.01.031>

KURUPPU, Sanjaya et al. The in vitro neurotoxic and myotoxic effects of the venom from the *Suta* genus (Curl Snakes) of elapid snakes. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 101, n. 6, p.407-410, 2007. <https://doi.org/10.1111/j.1742-7843.2007.00131.x>

KUZNETSOV, A. E. et al. Structural and electronic properties of bare and capped CdnSen/CdnTen nanoparticles (n = 6, 9). **The Journal Of Physical Chemistry C**, v. 116, n. 12, p.6817-6830, 2012. <https://doi.org/10.1021/jp2109187>

LABARRE, D. D; LOWY, R. J.. Improvements in methods for calculating virus titer estimates from TCID₅₀ and plaque assays. **Journal Of Virological Methods**, v. 96, n. 2, p.107-126, 2001. [https://doi.org/10.1016/S0166-0934\(01\)00316-0](https://doi.org/10.1016/S0166-0934(01)00316-0)

LEATHERDALE, C. A. et al. On the absorption cross section of CdSe nanocrystal quantum dots. **The Journal Of Physical Chemistry B**, v. 106, n. 31, p.7619-7622, 2002. <https://doi.org/10.1021/jp025698c>

LEIGUEZ, E. et al. A snake venom-secreted phospholipase A₂ induces foam cell formation depending on the activation of factors involved in lipid homeostasis. **Mediators Of Inflammation**, v. 2018, p.1-13, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/2547918>

LESCAR, J. et al. The dengue virus replication complex: from RNA replication to protein-protein interactions to evasion of innate immunity. **Advances In Experimental Medicine And Biology**, p.115-129, 2018. https://doi.org/10.1007/978-981-10-8727-1_9

LESLIE, Christina C.. Cytosolic phospholipase A₂: physiological function and role in disease. **Journal Of Lipid Research**, v. 56, n. 8, p.1386-1402, 2015. <https://doi.org/10.1194/jlr.R057588>

LI, J. et al. Quantum dot cluster (QDC)-loaded phospholipid micelles as a FRET probe for phospholipase A₂ detection. **RSC Advances**, v. 6, n. 19, p.15895-15899, 2016. <https://doi.org/10.1039/C5RA25292J>

LI, K. G. et al. Intracellular oxidative stress and cadmium ions release induce cytotoxicity of unmodified cadmium sulfide quantum dots. **Toxicology In Vitro**, v. 23, n. 6, p.1007-1013, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2009.06.020>

LIU, W. et al. Compact biocompatible quantum dots functionalized for cellular imaging. **Journal Of The American Chemical Society**, v. 130, n. 4, p.1274-1284, 2008. <https://doi.org/10.1021/ja076069p>

LIU, X. et al. In vivo cation exchange in quantum dots for tumor-specific imaging. **Nature Communications**, v. 8, n. 1, p.343, 2017. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00153-y>

LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J. M. Phospholipases A₂ From Viperidae snake venoms: How do they induce skeletal muscle damage?. **Acta Chimica Slovenica**, v. 58, p.647-659, 2011.

LOMONTE, B.; RANGEL, J.. Snake venom Lys49 myotoxins: From phospholipases A₂ to non-enzymatic membrane disruptors. **Toxicon**, v. 60, n. 4, p.520-530, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2012.02.007>

MADUWAGE, K.; ISBISTER, G. K.. Current treatment for venom-induced consumption coagulopathy resulting from snakebite. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 10, p.e3220, 2014. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003220>

MAL, J. et al. Metal chalcogenide quantum dots: biotechnological synthesis and applications. **RSC Advances**, v. 6, n. 47, p.41477-41495, 2016. <https://doi.org/10.1039/C6RA08447H>

MAMEDE, C. C. N. et al. Comparative analysis of local effects caused by *Bothrops alternatus* and *Bothrops moojeni* snake venoms: enzymatic contributions and inflammatory modulations. **Toxicon**, v. 117, p.37-45, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2016.03.006>

MANCINI, M. C. et al. Oxidative quenching and degradation of polymer-encapsulated quantum dots: new insights into the long-term fate and toxicity of nanocrystals in vivo. **Journal Of The American Chemical Society**, v. 130, n. 33, p.10836-10837, 2008. <https://doi.org/10.1021/ja8040477>

MARAGANORE, J. M. et al. A new class of phospholipases A₂ with lysine in place of aspartate 49. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 259, n. 22, p.13839-13843, 1984.

MARCUSSI, S. et al. Evaluation of the genotoxicity of *Crotalus durissus terrificus* snake venom and its isolated toxins on human lymphocytes. **Mutation Research/genetic Toxicology And Environmental Mutagenesis**, v. 724, n. 1-2, p.59-63, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2011.06.004>

MARCUSSI, S. et al. Genotoxic effect of *Bothrops* snake venoms and isolated toxins on human lymphocyte DNA. **Toxicon**, v. 65, p.9-14, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2012.12.020>

MARCUSSI, S. et al. Snake Venom Phospholipase A₂ Inhibitors: Medicinal Chemistry and Therapeutic Potential. **Current Topics In Medicinal Chemistry**, v. 7, n. 8, p.743-756, 2007. <https://doi.org/10.2174/156802607780487614>

MARTYNENKO, I. V. et al. Application of semiconductor quantum dots in bioimaging and biosensing. **Journal Of Materials Chemistry B**, v. 5, n. 33, p.6701-6727, 2017. <https://doi.org/10.1039/C7TB01425B>

MARTYNOV, V. I. et al. Synthetic fluorophores for visualizing biomolecules in living systems. **Acta Naturae**, v. 8, n. 4, p.33-46, 2016.

MATIAS, M. S. et al. BaltDC: purification, characterization and infrared spectroscopy of an antiplatelet DC protein isolated from *Bothrops alternatus* snake venom. **Journal Of Venomous Animals And Toxins Including Tropical Diseases**, v. 23, n. 1, p.23-36, 2017. <https://doi.org/10.1186/s40409-017-0126-7>

MELGAREJO, A. R.; CARDOSO, J. L. C. **Serpentes Peçonhentas no Brasil. Animais Peçonhentos no Brasil: Biologia, Clínica e Terapêutica dos Acidentes**, São Paulo: Sarvier, p. 33-61, 2003.

MENALDO, D. L. et al. Effects of two serine proteases from *Bothrops pirajai* snake venom on the complement system and the inflammatory response. **International Immunopharmacology**, v. 15, n. 4, p.764-771, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2013.02.023>

MENEZES, M. C. et al. Sex-based individual variation of snake venom proteome among eighteen *Bothrops jararaca* siblings. **Toxicon**, v. 47, n. 3, p.304-312, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2005.11.007>

MESQUITA, D. O.; BRITES, V. L. C. Aspectos taxonômicos e ecológicos de uma população de *Bothrops alternatus Duméril*, Bibron & Duméril, 1854 (Serpentes: Viperidae) das regiões do Triângulo e Alto Parnaíba, Minas Gerais. **Biologia Geral e Experimental**, v. 3, n. 2, p.33-38, 2003.

MASSIMINO, M. L. et al. Cell surface nucleolin interacts with and internalizes *Bothrops asper* Lys49 phospholipase A₂ and mediates its toxic activity. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p.10619, 2018. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-28846-4>

MONTECUCCO, C.; GUTIÉRREZ, J. M.; LOMONTE, B.. Cellular pathology induced by snake venom phospholipase A₂ myotoxins and neurotoxins: common aspects of their mechanisms of action. **Cellular And Molecular Life Sciences**, v. 65, n. 18, p.2897-2912, 2008. <https://doi.org/10.1007/s00018-008-8113-3>

MORA-OBANDO, D. et al. Synergism between Basic Asp49 and Lys49 phospholipase A₂ myotoxins of Viperid snake venom in vitro and in vivo. **Plos One**, v. 9, n. 10, p.e109846, 2014. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0109846>

MOREIRA, V. et al. An Asp49 Phospholipase A₂ from snake venom induces cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin E₂ production via activation of NF-κB, p38MAPK, and PKC in macrophages. **Mediators Of Inflammation**, v. 2014, p.1-10, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/105879>

MOSMANN, T.. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal Of Immunological Methods**, v. 65, n. 1-2, p.55-63, 1983. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4)

MU, X. et al. Black phosphorus quantum dot induced oxidative stress and toxicity in living cells and mice. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 9, n. 24, p.20399-20409, 2017. <https://doi.org/10.1021/acsami.7b02900>

MUKHERJEE, A. K; SAIKIA, D.; THAKUR, R. Medical and diagnostic applications of snake venom proteomes. **Journal of Proteins and Proteomics**, v. 2, n.1, p.31-40, 2011.

MULLER, V. D. M. et al. Crotoxin and phospholipases A₂ from *Crotalus durissus terrificus* showed antiviral activity against dengue and yellow fever viruses. **Toxicon**, v. 59, n. 4, p.507-515, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2011.05.021>

MULLER, V. D. et al. Phospholipase A₂ isolated from the venom of *Crotalus durissus terrificus* inactivates dengue virus and other enveloped viruses by disrupting the viral envelope. **Plos One**, v. 9, n. 11, p.e112351, 2014. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0112351>

MURAKAMI, M. T. et al. Crystal structure of a novel myotoxic Arg49 phospholipase A₂ homolog (zhaoermiatoxin) from *Zhaoermia mangshanensis* snake venom: Insights into Arg49 coordination and the role of Lys122 in the polarization of the C-terminus. **Toxicon**, v. 51, n. 5, p.723-735, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2007.11.018>

MURAKAMI, M. et al. Functional association of type IIA secretory phospholipase A₂ with the glycosylphosphatidylinositol-anchored heparan sulfate proteoglycan in the cyclooxygenase-2-mediated delayed prostanoid-biosynthetic pathway. **Journal Of Biological Chemistry**, v. 274, n. 42, p.29927-29936, 1999. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.42.29927>

NIENHAUS, L. et al. Imaging excited orbitals of quantum dots: experiment and electronic structure theory. **Journal Of The American Chemical Society**, v. 137, n. 46, p.14743-14750, 2015. <https://doi.org/10.1021/jacs.5b09272>

ÖHLER, M. et al. The venomics of *Bothrops alternatus* is a pool of acidic proteins with predominant hemorrhagic and coagulopathic activities. **Journal Of Proteome Research**, v. 9, n. 5, p.2422-2437, 2010. <https://doi.org/10.1021/pr901128x>

OJEDA, P. et al. Computational studies of snake venom toxins. **Toxins**, v. 10, n. 1, p.8-31, 2017. <https://doi.org/10.3390/toxins10010008>

OLIVEIRA, E. et al. Green and red fluorescent dyes for translational applications in imaging and sensing analytes: a dual-color flag. **Chemistryopen**, v. 7, n. 1, p.9-52, 2017. <https://doi.org/10.1002/open.201700135>

OLIVEIRA, F. de et al. Biochemical and functional characterization of BmooSP, a new serine protease from *Bothrops moojeni* snake venom. **Toxicon**, v. 111, p.130-138, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2016.01.055>

PACE, H. E.; LESHER, E. K.; RANVILLE, J. F.. Influence of stability on the acute toxicity of CdSe/ZnS nanocrystals to *Daphnia magna*. **Environmental Toxicology And Chemistry**, v. 29, n. 6, p.1338-1344, 2010. <https://doi.org/10.1002/etc.168>

PANG, X-Y. et al. Structure/function relationships of adipose phospholipase A2 containing a Cys-His-His catalytic triad. **Journal Of Biological Chemistry**, v. 287, n. 42, p.35260-35274, 2012. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.398859>

PANIAGUA, D. et al. Role of Lymphatic System on Snake Venom Absorption. **Snake Venoms**, p.1-19, 2015. https://doi.org/10.1007/978-94-007-6648-8_10-1

PEREIRA, M. F. et al. The amino acid sequence of Bothropstoxin-II, an Asp-49 Mmyotoxin from *Bothrops jaramcussu* (Jararacucu) venom with low phospholipase A₂ activity. **Journal of Protein Chemistry**, v. 17, n. 4, p.381-386, 1989.

PETROVIC, U. et al. Ammodytoxin, a neurotoxic secreted phospholipase A₂, can act in the cytosol of the nerve cell. **Biochemical And Biophysical Research Communications**, v. 324, n. 3, p.981-985, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.09.144>

PILLA, V. et al. Fluorescence quantum efficiency of CdSe/CdS magic-sized quantum dots functionalized with carboxyl or hydroxyl groups. **Chemical Physics Letters**, v. 580, p.130-134, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.cplett.2013.07.007>

PU, Y. et al. Colloidal synthesis of semiconductor quantum dots toward large-scale production: a review. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 57, n. 6, p.1790-1802, 2018. <https://doi.org/10.1021/acs.iecr.7b04836>

QUEIROZ, M. R. de. et al. Purification and characterization of BmooAi: a new toxin from *Bothrops moojeni* snake venom that inhibits platelet aggregation. **Biomed Research International**, v. 2014, p.1-7, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/920942>

QIU, M. et al. The impact of hemocoagulase for improvement of coagulation and reduction of bleeding in fracture-related hip hemiarthroplasty geriatric patients: A prospective, single-blinded, randomized, controlled study. **Injury**, v. 48, n. 4, p.914-919, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.injury.2016.11.028>

RAMANADHAM, S. et al. Calcium-independent phospholipases A₂ and their roles in biological processes and diseases. **Journal Of Lipid Research**, v. 56, n. 9, p.1643-1668, 2015. <https://doi.org/10.1194/jlr.R058701>

RESCH-GENGER, U. et al. Quantum dots versus organic dyes as fluorescent labels. **Nature Methods**, v. 5, n. 9, p.763-775, 2008. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1248>

RIEHLE, F. S. et al. Blue luminescence and superstructures from magic size clusters of CdSe. **Nano Letters**, v. 9, n. 2, p.514-518, 2009. <https://doi.org/10.1021/nl080150o>

RIGONI, M. et al. Snake phospholipase A₂ neurotoxins enter neurons, bind specifically to mitochondria, and open their transition pores. **Journal Of Biological Chemistry**, v. 283, n. 49, p.34013-34020, 2008. <https://doi.org/10.1074/jbc.M803243200>

RODRIGUES, Jessica Peixoto. **Avaliação *in vitro* da atividade antihelmíntica da toxina BnSP-6 contra Strongyloides venezuelensis e seu rastreamento utilizando CdSe/CdS Magic Sized Quantum Dots**. 2017. 52 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2017.

RODRIGUES, M. A. P. et al. Rat atrial responses to *Bothrops jararacussu* (jararacuçu) snake venom. **Toxicology**, v. 323, p.109-124, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2014.06.010>

ROSENTHAL, S. J. et al. Biocompatible quantum dots for biological applications. **Chemistry & Biology**, v. 18, n. 1, p.10-24, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2010.11.013>

ROTHMAN, A. L. et al. Immunopathogenesis versus protection in dengue virus infections. **Current Tropical Medicine Reports**, v. 1, n. 1, p.13-20, 2013. <https://doi.org/10.1007/s40475-013-0009-0>

RUGOLO, M.; DOLLY, J. O.; NICHOLLIS, D. G. The mechanism of action of f-bungarotoxin at the presynaptic plasma membrane. **Biochemical Journal**, v. 233, p.519-523, 1986. <https://doi.org/10.1042/bj2330519>

SAMY, R. P. et al. Snake venom phospholipases A₂: a novel tool against bacterial diseases. **Current Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 36, p.6150-6162, 2012. <https://doi.org/10.2174/092986712804485791>

SAMY, R. P. et al. Antimicrobial proteins from snake venoms: direct bacterial damage and activation of innate immunity against *Staphylococcus aureus* skin infection. **Current Medicinal Chemistry**, v. 18, n. 33, p.5104-5113, 2011. <https://doi.org/10.2174/092986711797636108>

SANCHEZ, E. et al. Direct fibrinolytic snake venom metalloproteinases affecting hemostasis: structural, biochemical features and therapeutic potential. **Toxins**, v. 9, n. 12, p.392-409, 2017. <https://doi.org/10.3390/toxins9120392>

SANHAJARIYA, S.; DUFFULL, S.; ISBISTER, G.. Pharmacokinetics of snake venom. **Toxins**, v. 10, n. 2, p.73-93, 2018. <https://doi.org/10.3390/toxins10020073>

SANTOS-FILHO, N. A. et al. A new acidic myotoxic, anti-platelet and prostaglandin I₂ inductor phospholipase A₂ isolated from *Bothrops moojeni* snake venom. **Toxicon**, v. 52, n. 8, p.908-917, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2008.08.020>

SCHALOSKE, R. H.; DENNIS, E. A.. The phospholipase A₂ superfamily and its group numbering system. **Biochimica Et Biophysica Acta (bba) - Molecular And Cell Biology Of Lipids**, v. 1761, n. 11, p.1246-1259, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2006.07.011>

SCHOLES, G. D.; RUMBLES, G.. Excitons in nanoscale systems. **Nature Materials**, v. 5, n. 9, p.683-696, 2006. <https://doi.org/10.1038/nmat1710>

SETÚBAL, S. S. et al. Action of two phospholipases A₂ purified from *Bothrops alternatus* snake venom on macrophages. **Biochemistry (moscow)**, v. 78, n. 2, p.194-203, 2013. <https://doi.org/10.1134/S0006297913020089>

SHANBHAG, V. K. L.. Applications of snake venoms in treatment of cancer. **Asian Pacific Journal Of Tropical Biomedicine**, v. 5, n. 4, p.275-276, 2015. [https://doi.org/10.1016/S2221-1691\(15\)30344-0](https://doi.org/10.1016/S2221-1691(15)30344-0)

SHASHKOVA, S.; LEAKE, M. C.. Single-molecule fluorescence microscopy review: shedding new light on old problems. **Bioscience Reports**, v. 37, n. 4, p.BSR20170031, 2017. <https://doi.org/10.1042/BSR20170031>

SHEN, Z.; CHO, W.. Membrane leakage induced by synergetic action of Lys-49 and Asp-49 *Agkistrodon piscivorus piscivorus* phospholipases A₂: Implications in their pharmacological activities. **The International Journal Of Biochemistry & Cell Biology**, v. 27, n. 10, p.1009-1013, 1995. [https://doi.org/10.1016/1357-2725\(95\)00072-W](https://doi.org/10.1016/1357-2725(95)00072-W)

SHIMIZU, J. F. et al. Multiple effects of toxins isolated from *Crotalus durissus terrificus* on the hepatitis C virus life cycle. **Plos One**, v. 12, n. 11, p.e0187857, 2017. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187857>

SHIRASAKI, Y. et al. Emergence of colloidal quantum-dot light-emitting technologies. **Nature Photonics**, v. 7, n. 1, p.13-23, 2013. <https://doi.org/10.1038/nphoton.2012.328>

SIEUWERTS, A. M. et al. The MTT tetrazolium salt assay scrutinized: How to use this assay reliably to measure metabolic activity of cell cultures in vitro for the assessment of growth characteristics, IC50-values and cell survival. **European Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry**, v. 33, n. 11, p.813-823, 1995. <https://doi.org/10.1515/cclm.1995.33.11.813>

SILVA, A. C. A. et al. Biological analysis and imaging applications of CdSe/CdS_xSe_{1-x}/CdS core-shell magic-sized quantum dot. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 12, n. 5, p.1421-1430, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2016.01.001>

SILVA, A. C. A.. **Pontos quânticos semicondutores sintetizados via soluções coloidais aquosas: estudos e aplicações nanobiotecnológicas**. 2014. 142 f. Tese (Doutorado) - Curso de Pós Graduação em Física, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2014.

SILVA, A. C. A. et al. Highly stable luminescence of CdSe magic-sized quantum dots in HeLa cells. **Sensors And Actuators B: Chemical**, v. 191, p.108-114, 2014a. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2013.09.063>

SILVA, A. C. A. et al. Controlling the cytotoxicity of CdSe magic-sized quantum dots as a function of surface defect density. **Nano Letters**, v. 14, n. 9, p.5452-5457, 2014b. <https://doi.org/10.1021/nl5028028>

SILVA, A. C. A. et al. Shell thickness modulation in ultrasmall CdSe/CdS_xSe_{1-x}/CdS core/shell quantum dots via 1-thioglycerol. **ACS Nano**, v. 8, n. 2, p.1913-1922, 2014c. <https://doi.org/10.1021/nn406478f>

SILVA, A. C. A. et al. Modified phonon confinement model and its application to CdSe/CdS core-shell magic-sized quantum dots synthesized in aqueous solution by a new route. **The Journal Of Physical Chemistry C**, v. 117, n. 4, p.1904-1914, 2013. <https://doi.org/10.1021/jp308500r>

SILVA, E. S.; BOCHNER, R.; GIMÉNEZ, A. R. M. O ensino das principais características das serpentes peçonhentas brasileiras: avaliação das literaturas didáticas no ensino fundamental do município do rio de janeiro. **Educar em Revista**, n. 42, p.297-316, 2011. <https://doi.org/10.1590/S0104-40602011000500019>

SILVA, M. A. et al. Genotoxic effects of BnSP-6, a Lys-49 phospholipase A₂ (PLA₂) homologue from *Bothrops pauloensis* snake venom, on MDA-MB-231 breast cancer cells. **International Journal Of Biological Macromolecules**, v. 118, p.311-319, 2018a. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.06.082>

SILVA, A. C. A. et al. Biocompatible magic sized quantum Dots: luminescent markers and probes. In: GHAMSARI, Morteza Sasani. **State of the Art in Nano-bioimaging**. London: Intechopen, 2018b. p. 1-114. <https://doi.org/10.5772/intechopen.72841>

SMITH, A. M. et al. A systematic examination of surface coatings on the optical and chemical properties of semiconductor quantum dots. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 8, n. 33, p.3895-3903, 2006. <https://doi.org/10.1039/b606572b>

SMITH, A. M.; NIE, S.. Semiconductor nanocrystals: structure, properties, and band gap engineering. **Accounts Of Chemical Research**, v. 43, n. 2, p.190-200, 2010. <https://doi.org/10.1021/ar9001069>

SOMERS, R. C.; BAWENDI, M. G.; NOCERA, D. G.. CdSe nanocrystal based chem-/bio- sensors. **Chemical Society Reviews**, v. 36, n. 4, p.579-591, 2007. <https://doi.org/10.1039/b517613c>

SOUZA, K. R. et al. Saberes e práticas sobre controle do *Aedes aegypti* por diferentes sujeitos sociais na cidade de Salvador, Bahia, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 34, n. 5, p.e00078017, 2018. <https://doi.org/10.1590/0102-311x00078017>

SOUZA, V. M. M. de et al. Avaliação do conhecimento, atitudes e práticas sobre dengue no Município de Pedro Canário, Estado do Espírito Santo, Brasil, 2009: um perfil ainda atual. **Revista Pan-amazônica de Saúde**, v. 3, n. 1, p.37-43, 2012. <https://doi.org/10.5123/S2176-62232012000100006>

STÁBELI, R. G. et al. Cytotoxic l-amino acid oxidase from *Bothrops moojeni*: Biochemical and functional characterization. **International Journal Of Biological Macromolecules**, v. 41, n. 2, p.132-140, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2007.01.006>

STOCKER, K.; BARLOW, G. H.. The coagulant enzyme from *Bothrops atrox* venom (batroxobin). **Part B: Proteolytic Enzymes**, p.214-223, 1976. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(76\)45021-8](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(76)45021-8)

STUART, B. H.. Infrared spectroscopy: fundamentals and applications. **New Jersey: John Wiley & Sons**, 2004. 244 p. <https://doi.org/10.1002/0470011149>

SUN, G. et al. Targeting breast cancer cells with a CuInS₂/ZnS quantum dot-labeled Ki-67 bioprobe. **Oncology Letters**, v. 15, n. 2, p.2471-2476, 2017. <https://doi.org/10.3892/ol.2017.7615>

SUN, J. et al. The epidemiological characteristics and molecular phylogeny of the dengue virus in Guangdong, China, 2015. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p.1-14, 2018. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-28349-2>

SUSUMU, K. et al. Enhancing the stability and biological functionalities of quantum dots via compact multifunctional ligands. **Journal Of The American Chemical Society**, v. 129, n. 45, p.13987-13996, 2007. <https://doi.org/10.1021/ja0749744>

SWENSON, E. S. et al. Limitations of green fluorescent protein as a cell lineage marker. **Stem Cells**, v. 25, n. 10, p.2593-2600, 2007. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2007-0241>

TASOULIS, T.; ISBISTER, G. A Review and Database of Snake Venom Proteomes. **Toxins**, v. 9, n. 9, p.290-112, 2017. <https://doi.org/10.3390/toxins9090290>

TEIXEIRA, C. de F. P. et al. Inflammatory effects of snake venom metalloproteinases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 1, p.181-184, 2005. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762005000900031>

TIMILSINA, S. et a. Comparative structural analysis of phospholipase A₂ and combinatorial screening of PLA₂ Inhibitors. **International Journal of Biometrics and Bioinformatics (IJBB)**, v. 7, n. 1, p.14-26, 2013.

TONELLO, F. et al. A Lys49-PLA₂ myotoxin of *Bothrops asper* triggers a rapid death of macrophages that involves autocrine purinergic receptor signaling. **Cell Death & Disease**, v. 3, n. 7, p.343-343, 2012. <https://doi.org/10.1038/cddis.2012.68>

UDUPA, E. G.; RAO, N. M.. Inhibition of angiotensin converting enzyme from sheep tissues by captopril, lisinopril and enalapril. **Indian Journal of Biochemistry & Biophysics**, v. 34, n. 6, p.524-528, 1997.

UNNI, C.; PHILIP, D.; GOPCHANDRAN, K. G.. Studies on optical absorption and photoluminescence of thioglycerol-stabilized CdS quantum dots. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 71, n. 4, p.1402-1407, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2008.04.023>

URRA, F.; ARAYA-MATURANA, R.. Targeting metastasis with snake toxins: molecular mechanisms. **Toxins**, v. 9, n. 12, p.390-401, 2017. <https://doi.org/10.3390/toxins9120390>

UTKIN, Y. N. et al. Conjugates of α -Cobrotoxin with CdSe quantum dots: preparation and biological activity. **Nano Hybrids And Composites**, v. 13, p.3-8, 2017. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/NHC.13.3>

VALENTINE, C. D.; VERKMAN, A. S.; HAGGIE, P. M.. Protein trafficking rates assessed by quantum dot quenching with bromocresol green. **Traffic**, v. 13, n. 1, p.25-29, 2011. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2011.01287.x>

VÉLEZ, S. M. et al. Geographical variability of the venoms of four populations of *Bothrops asper* from Panama: Toxicological analysis and neutralization by a polyvalent antivenom. **Toxicon**, v. 132, p.55-61, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2017.04.002>

VIJA, H. et al. Purification, characterization, and cDNA cloning of acidic platelet aggregation inhibiting phospholipases A₂ from the snake venom of *Vipera lebetina* (Levantine viper). **Toxicon**, v. 54, n. 4, p.429-439, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2009.05.010>

WALKEY, C.; SYKES, E. A.; CHAN, W. C. W.. Application of semiconductor and metal nanostructures in biology and medicine. **Hematology**, v. 2009, n. 1, p.701-707, 2009. <https://doi.org/10.1182/asheducation-2009.1.701>

WANG, D. et al. Can graphene quantum dots cause DNA damage in cells? **Nanoscale**, v. 7, n. 21, p.9894-9901, 2015. <https://doi.org/10.1039/C5NR01734C>

WANG, Y.; TANG, M.. Dysfunction of various organelles provokes multiple cell death after quantum dot exposure. **International Journal Of Nanomedicine**, v. 13, p.2729-2742, 2018. <https://doi.org/10.2147/IJN.S157135>

WARRELL, D. A.. World Health Organization: Guidelines for the clinical management of snake bites in the Southeast Asian region. **The Southeast Asian journal of tropical medicine and public health**, v. 30 Suppl 1, p.1-85, 1999.

WARRIER, S.; KHARKAR, P. S. Fluorescent probes for biomedical applications (2009-2014). **Pharmaceutical Patent Analyst**, v. 3, n. 5, p.543-560, 2014. <https://doi.org/10.4155/ppa.14.41>

WEGNER, K. D.; HILDEBRANDT, N.. Quantum dots: bright and versatile in vitro and in vivo fluorescence imaging biosensors. **Chemical Society Reviews**, v. 44, n. 14, p.4792-4834, 2015. <https://doi.org/10.1039/C4CS00532E>

WEI, J-F. et al. N49 phospholipase A₂, a unique subgroup of snake venom group II phospholipase A₂. **Biochimica Et Biophysica Acta (bba) - General Subjects**, v. 1760, n. 3, p.462-471, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2005.11.022>

WELSCH, S. et al. Composition and three-dimensional architecture of the dengue virus replication and assembly sites. **Cell Host & Microbe**, v. 5, n. 4, p.365-375, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2009.03.007>

WELSCH, S.; MÜLLER, B.; KRÄUSSLICH, H-G. More than one door - Budding of enveloped viruses through cellular membranes. **FEBS Letters**, v. 581, n. 11, p.2089-2097, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2007.03.060>

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Dengue and severe dengue. 2018. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dengue-and-severe-dengue>>. Acesso em: 02 dez. 2018.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Dengue vaccine research. 2017. Disponível em: https://www.who.int/immunization/research/development/dengue_vaccines/en/. Acesso em: 05 jan. 2019.

XIA, Y-S.; ZHU, C-Q. Aqueous synthesis of luminescent magic sized CdSe nanoclusters. **Materials Letters**, v. 62, n. 14, p.2103-2105, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2007.11.027>

XING, Y. et al. Bioconjugated quantum dots for multiplexed and quantitative immunohistochemistry. **Nature Protocols**, v. 2, n. 5, p.1152-1165, 2007. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.107>

YAN, F. et al. Fluorescein applications as fluorescent probes for the detection of analytes. **Trac Trends In Analytical Chemistry**, v. 97, p.15-35, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2017.08.013>

YONG, K-T. et al. Preparation of quantum dot/drug nanoparticle formulations for traceable targeted delivery and therapy. **Theranostics**, v. 2, n. 7, p.681-694, 2012. <https://doi.org/10.7150/thno.3692>

ZELANIS, A. et al. A transcriptomic view of the proteome variability of newborn and adult Bothrops jararaca snake venoms. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 3, p.e1554, 2012. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001554>

ZHAO, C. et al. Cobra neurotoxin produces central analgesic and hyperalgesic actions via adenosine A₁ and A_{2A} receptors. **Molecular Pain**, v. 13, p.174480691772033, 2017. <https://doi.org/10.1177/1744806917720336>

ZHOU, J. et al. Surface ligands engineering of semiconductor quantum dots for chemosensory and biological applications. **Materials Today**, v. 20, n. 7, p.360-376, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.mattod.2017.02.006>

ZHUO, S.; SHAO, M.; LEE, S-T.. Upconversion and downconversion fluorescent graphene quantum dots: ultrasonic preparation and photocatalysis. **Acs Nano**, v. 6, n. 2, p.1059-1064, 2012. <https://doi.org/10.1021/nn2040395>

ZHU, Z-J. et al. Stability of quantum dots in live cells. **Nature Chemistry**, v. 3, n. 12, p.963-968, 2011. <https://doi.org/10.1038/nchem.1177>

ZRAZHEVSKIY, P.; SENA, M.; GAO, X.. Designing multifunctional quantum dots for bioimaging, detection, and drug delivery. **Chemical Society Reviews**, v. 39, n. 11, p.4326-4354, 2010. <https://doi.org/10.1039/b915139g>

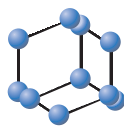
ANEXOS

Artigos publicados relacionados ao tema da tese:

Anexo I: “BaltPLA₂: A new phospholipase A₂ from *Bothrops alternatus* snake venom with antiplatelet aggregation activity”.

Anexo II: “In vitro tracking of phospholipase A₂ from snake venom conjugated with magic-sized quantum dots”.

RESEARCH ARTICLE

BENTHAM
SCIENCE

BaltPLA₂: A New Phospholipase A₂ from *Bothrops alternatus* Snake Venom with Antiplatelet Aggregation Activity



Edigar Henrique Vaz Dias¹, Tamires dos Santos Paschoal¹, Alisson Pereira da Silva¹, DéborahFernanda da Cunha Pereira¹, Bruna Barbosa de Sousa Simamoto¹, Mariana Santos Matias¹, Fernanda Maria Santiago¹, José Cesar Rosa², Andreimar Soares³, Norival A. Santos-Filho⁴, Fábio de Oliveira⁵ and Carla Cristine Neves Mamede^{6,*}

¹Federal University of Uberlândia, Molecular and Cellular Biology Laboratory, Uberlândia, Brazil; ²Department of Cellular and Molecular Biology and Pathogenic Bioagents and Center for Protein Chemistry, São Paulo University, São Paulo, Brazil; ³Center for the Study of Biomolecules Applied to Health - CEBio, Oswaldo Cruz Foundation, FIOCRUZ Rondônia and Health Center, Federal University of Rondônia, UNIR, Porto Velho-RO, Brazil; ⁴Institute of Chemistry - UNESP Araraquara, São Paulo, Brazil; ⁵Federal University of Uberlândia, Institute of Biomedical Science, Uberlândia, Brazil; ⁶Federal University of Uberlândia - Institute of Agricultural Sciences Uberlândia, Uberlândia, Brazil

Abstract: Background: In last decades, snake venoms have aroused great interest of the medicine due to the pathophysiological effects caused by their toxins. These include the phospholipases A₂, low molecular weight proteins capable of causing haemorrhagic, myotoxic, inflammatory and neurotoxic effects after an ophidian accident. The present work describes the isolation and biochemical characterization of a new PLA₂ isolated from the *B. alternatus* snake venom, which was named BaltPLA₂.

Method: The rapid and efficient purification of this toxin was performed using only two chromatography steps (anion exchange and hydrophobic chromatography).

Results: BaltPLA₂ is an acidic protein (pI 4.4) with an apparent molecular mass of 17000 (SDS-PAGE) and 14074.74 Da (MALDI TOF/TOF). Analysis of fragments ion by MS / MS showed the following internal amino acid sequence SGVIICGEGTPCEK, which did not exhibit homology with other PLA₂ from the same venom. BaltPLA₂ is a catalytically active, which displayed an anticoagulant action, inhibition of platelet aggregation induced by epinephrine (~ 80%) and ADP (24%). BaltPLA₂ also was able to induce myonecrosis and the release of cytokines (IL-10, IL-12 and TNF-α) in macrophages culture.

Conclusion: The results presented in this work greatly contribute to a better understanding of the mechanism of enzymatic and pharmacological actions of PLA₂s from snake venoms and they may contribute to its application in medical research.

Keywords: *Bothrops alternatus*, phospholipases A₂, platelet aggregation, inflammation, snake venom, myonecrosis.

1. INTRODUCTION

In last decades, snake venoms have been well studied. Their organic and inorganic components cause several pathophysiological effects when inoculated in prey and victims. The qualitative and quantitative composition of the venom may vary according to the species, age, diet and sex. In addition, the environmental conditions are very important for the final snake venom composition [1-4]. Snake venoms is a mixture of protein components, containing phospholipases A₂, metalloproteinases, serine proteinases and L-amino acid oxidases [5-7].

*Address correspondence to this author at the Federal University of Uberlândia, Molecular and Cellular Biology Laboratory, Uberlândia, Brazil; Tel: +55 34 32182200; E-mail: carlamamede@ufu.br

Snake venom Phospholipases A₂ (svPLA₂) are low molecular mass molecules (14-21 kDa). These molecules are responsible for neurotoxic, myotoxic, inflammatory, cardiotoxic, hemolytic, anticoagulant and hypotensive effects caused by snake envenomations [8-11]. svPLA₂s are divided into groups according to their amino acid sequences, enzymatic activities and phospholipid specificity [12, 13]. svPLA₂s can be classified according to structural characteristics into Asp49 or Lys49-PLA₂ [14]. Asp49 svPLA₂s are catalytically active. They are particularly dependent on Ca²⁺ ion for their function and they are capable of hydrolyzing the 2-acyl ester linkage of the sn-2 position of the phospholipids, releasing fatty acids and lysophospholipids [12, 15]. On the other hand, Lys49 svPLA₂s do not present

enzymatic activity and their mechanism of action is not fully elucidated [16].

The knowledge of structural characteristics and biological activities of svPLA₂s contribute to the understanding of pathophysiological effects generated by these enzymes. An increasing number of studies has demonstrated that svPLA₂s exhibit potential pharmacological activities such as anticoagulant, antiparasitic, antibacterial, antiviral and anti-tumor agents, which make them important for the development of new therapeutic alternatives [17-22]. In this work, we describe the isolation and characterization of a new phospholipase A₂ isolated from *B. alternatus* snake venom that inhibits platelet aggregation.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1. Animals

All the protocols used in this work involving animals [Swiss mice (20-25 g) and Wistar rats (180-200 g)] were submitted and approved by the Ethics Committee on Animal Use (CEUA) of the Federal University of Uberlândia (Protocol Number 108/12). The animals were kept under controlled conditions of temperature, humidity and light / dark cycles and they had free access to water and food until the end of the experiments. After the experiments, all animals were euthanized with high doses of a mix of ketamine (100 mg/mL) and xylazine (100 mg/mL).

2.2. Blood Collection

Human blood was obtained through donation from volunteers. The protocol for the collection was submitted and approved by the Committee of Ethics in Research with Human (CEP) of the Federal University of Uberlândia (Protocol Number 1,627,982 / 2016).

2.3. Purification of BaltPLA₂

B. alternatus crude venom was purchased from the serpentarium Bioagents (Batatais, SP, Brazil). First, the crude venom (400 mg) was fractionated on ion exchange chromatography using a DEAE-Sephacel column (1.5 x 15 cm) in an increasing gradient of ammonium bicarbonate buffer (0.05 - 1M, pH 7.8). The fraction A6 (60 mg) was pooled, lyophilized, dissolved in 0.01 M Tris-HCl (pH 8.5) and submitted on a hydrophobic interaction chromatography on a Phenyl-Sepharose column (1.5 x 2.5 cm) in a decreasing gradient of NaCl (4 to 0 M). All the fractions were eluted at a flow rate of 20 mL/h and monitored at 280 nm on a Bio-Spec-Mini UV-Visible spectrophotometer (Shimadzu Corp., Kyoto, Japan). The protein concentration was estimated according to the method of Bradford [23].

2.4. Electrophoretic Analysis

Sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (14 % SDS-PAGE), under reducing and non-reducing conditions, was performed as described by [24]. The molecular mass of BaltPLA₂ was estimated by comparing the relative migration of standard proteins (LMW-SDS Marker Kit; GE Healthcare Life Sciences, UK). The isoelectric point of BaltPLA₂ was determined by two-

dimensional electrophoresis as previously described by Da Silva [25] using a III IPGphor System (GE Healthcare LifeSc.).

2.5. Circular Dichroism (CD) Spectroscopy

Secondary structure of BaltPLA₂ (1mg / mL) was determined by CD spectroscopy in the "far-UV" spectral region (190-250 nm) using a JASCO J-815 spectrophotometer (Jasco Corp., Japan) according to the methodology described by Oliveira *et al.* [26]. In this procedure, a nitrogen discharge was used in 1 mm quartz cuvette in phosphate-buffered saline (PBS) at room temperature.

2.6. *In situ* and in Solution Trypsin Digestion of BaltPLA₂ for Mass Spectrometry Analysis

BaltPLA₂ analysis in mass spectrometry was performed according to Palacio *et al.*, [27] with some modifications. Each peptide ion detected was subjected to a CID-MS/MS *via* DDA yielding b and y type ion fragments that were used to match the respective amino acid sequences of the peptides. MassLynx 4.1 generated a peak list file that was used for database search. Peak list file was submitted to MASCOT v.2.4.2 and searched against SwissProt and NCBI nr using tolerance of 1.2 Da for precursor ion and 0.6 Da for the product ions, fixed modification as carbamidomethylation and variable modification as methionine oxidation. Trypsin hydrolysis allowed 1 missed cleavage. Sequences of BaltPLA₂ fragments obtained by mass spectrometry were compared with other proteins using BLAST (Basic Local Alignment Search) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

2.7. Phospholipase A₂ Activity

Indirect hemolytic activity (PLA₂ activity) was carried out according to the methodology described by Gutiérrez *et al.* [28]. Briefly, increasing concentrations of BaltPLA₂ (1.5-30 µg / 50 µl PBS) was added in an agarose gel containing egg yolk and erythrocytes and incubated for 24h and 48h at room temperature. Crude venom and PBS were used as positive and negative controls, respectively. The experiments were performed in triplicates and the phospholipase A₂ activity was measured through the hemolytic halo area (cm³).

2.8. Defibrinating Activity

Defibrinating activity was carried out according to the methodology described by Gené *et al.* [29]. Briefly, BaltPLA₂ (50 µg / µL PBS) were injected intraperitoneally into a group of mice (*n* = 3). Negative control group received only PBS. After 1h, both groups were euthanized and then the blood was collected by cardiac puncture and kept in anticoagulant free tubes, at room temperature, until clot formation.

2.9. Platelet Aggregation

Platelet aggregation assays were performed with human Platelet-Rich Plasma (PRP) and measured using an automate channel Aggregometer (AggRAMTM version 1.1, Helena Laboratories, USA) as previously described by Queiroz *et al.* [25]. BaltPLA₂ (1 µg) was incubated with the

PRP for 15 minutes prior to the addition of the platelet aggregation inducers, ADP (20 M) or epinephrine (300 M).

2.10. Myotoxic Activity

Myotoxicity assays were evaluated through morphological alterations induced by intramuscular injections of BaltPLA₂ (30 µg/50 µL PBS) as previously described by Mamede *et al.* [30].

2.11. Cytokine Measurements

Macrophage precursor cells were obtained from the bone marrow of the femur and tibia of mice and differentiated into macrophages in RPMI-1640 medium supplemented with 30% L929-Cell Conditioned Medium (LCCM). Macrophage culture was performed on 96-well polystyrene plates for 18 h in a humidified 37°C/5 % CO₂ incubator. Then the cells were treated with different concentrations of crude venom and BaltPLA₂ (1.5 - 15 µg / mL) for 24 h. Finally, the plate was centrifuged at 500 xg for 5 minutes and the supernatant collected for the measurement of interleukins. IL-10, IL-12 and TNF-α levels were determined in supernatants from cell cultures and serum samples using a commercial ELISA kit, following the manufacturer's instructions.

2.12. Statistical Analysis

The statistical analyses were carried out by ANOVA (GraphPad Prism program version 5.0, GraphPad Software Inc, USA). Differences with P values of less than 5 % (P < 0.05) were considered significant.

3. RESULTS AND DISCUSSION

The study of the involvement of PLA₂s in the pathophysiological effects due to ophidic envenomation is of great importance for medicine. The biochemical characterization of these enzymes contributes to the understanding of the myotoxic, neurotoxic, cardiotoxic, inflammatory and haematological effects caused by them [8-10]. In the present work, we describe the purification and biochemical characterization of BaltPLA₂, a new phospholipase A₂ from *B. alternatus* snake venom, which is able to inhibit platelet aggregation.

The new PLA₂ was obtained by only two purification steps. First of all, *B. alternatus* crude venom (400 mg) was submitted to ion exchange chromatography (DEAE-Sephacel) and resulted in 10 main fractions, which were named from A1 to A10 (Figure 1A). The fraction A6 (60 mg), which had the highest PLA₂ among all the fractions tested (data not shown), was applied to a hydrophobic interaction chromatography (Phenyl-Sepharose) (Figure 1B). The second fraction of this chromatography (1.5 mg) represented about 0.04% of the total venom (Table 1) and it was called BaltPLA₂. This toxin (30 µg) presented PLA₂ activity about three times larger than the crude venom (Table 2). These results show that the purification process of BaltPLA₂, used in this work, was quite efficient since the purification of bothropic PLA₂ is commonly carried out in three or more chromatographic steps, as for

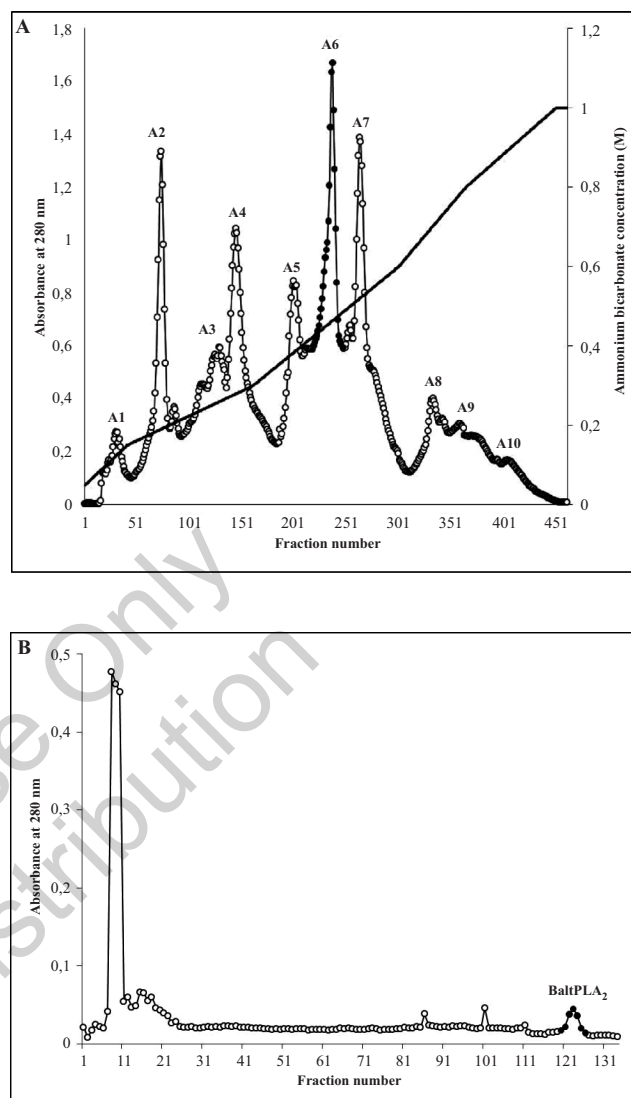


Figure 1. Purification of BaltPLA₂. (A) *B. alternatus* crude venom (400 mg) was applied on ion exchange chromatography (DEAE-Sephacel column: 1.5 x 15 cm) in an increasing gradient of ammonium bicarbonate buffer (0.05 - 1M, pH 7.8). (B) fraction A6 (60 mg) was submitted to hydrophobic interaction chromatography (Phenyl-Sepharose column: 1.5 x 2.5 cm) in a decreasing gradient of NaCl (4 to 0 M). All The fractions were eluted at a flow rate of 20 mL/h and monitored at 280 nm. Pooled fractions are indicated by the closed circle.

Table 1. Protein recovery of BaltPLA₂.

Sample	Protein (mg)*	Protein Recovery (%)
Crude venom	400	100
A6	60	24
BaltPLA ₂	1.5	0.04

* Protein concentrations were determined by the Bradford method

Table 2. PLA₂ activity of BaltPLA₂ and *B. alternatus* crude venom.

Dose (µg/50µL)	Crude Venom		BaltPLA ₂	
	24 h	48h	24h	48h
1.5	0.00	0.00	*1.11 ± 0.23	*1.75 ± 0.66
3.5	0.00	*0.74 ± 0.12	*1.23 ± 0.17	*2.70 ± 0.51
15	*0.92 ± 0.04	*1.46 ± 0.30	*2.45 ± 0.08	*4.97 ± 0.21
30	*1.01 ± 0.07	*2.03 ± 0.25	*3.14 ± 0.00	*6.11 ± 0.13

PLA₂ activity of BaltPLA₂ and crude venom at different doses (1.5-30 µg/50 µL) for 24 h and 48 h of incubation. Negative control (PBS) did not induce PLA₂ activity. Each value is the mean ± SD of hemolytic halo area of triplicate. * P < 0.05, compared with positive control (crude venom).

example in the purification of Braziliase-I and II from *B. Brazili* [21], BmooTX-I from *B. moojeni* [31], Bl-PLA₂ from *B. leucurus* [32], BpPLA₂-TXI from *B. pauloensis* [33] and theBaltTX-I and BaltTX-II from *B. alternatus* [34].

Electrophoretic analysis revealed that BaltPLA₂ is composed of a single polypeptide chain and it has an apparent molecular mass of 17 kDa (Figure 2A). Its isoelectric point is around 4.4, which characterizes it as an acidic PLA₂ (Figure 2B). BaltPLA₂ was also analysed by mass spectrometry. Our results showed that the enzyme has a high purity and has a molecular mass of 14,074.74 Da (Figure 3). The molecular mass of BaltPLA₂ is similar to other bothropic PLA₂s, such as MTX (I-III) [35], BLK-PLA₂ and BLD-PLA₂ [36] and BmarPLA₂ [37]. Fragments of ions were used to determine an internal amino acid sequence of BaltPLA₂ (SGVIICGEGTPCEK), which exhibited 100% identity with other bothropic PLA₂s, as well as PLA₂s from genera *Sistrurus* and *Crotalus* (Figure 4). On the other hand, BaltPLA₂ did not exhibit homology with other PLA₂ from the same venom. This result suggests that BaltPLA₂ is a new PLA₂ purified from *B. alternatus* snake venom. In addition, circular dichroism spectroscopy showed that BaltPLA₂ contains α-helix components similar to BmajPLA₂-II [38] and BthTX-I [39] (Figure 5).

It is known that the catalytic activity of purified PLA₂ from snake venom is dependent on the Ca²⁺ ions, which is coordinated by the aspartic acid residue located at position 49 of the enzyme [15]. The substitution of Asp 49 by Lys 49 makes it impossible to coordinate this ion and consequently the enzyme loses its catalytic activity [40]. The high activity PLA₂ presented by BaltPLA₂ allows us to classify it as a Asp49 svPLA₂, as well as BpirPLA₂-I [41], Piratoxin-III [42], Bj IV [43] and BmooTX-I [44].

BaltPLA₂ has been shown to be important in hemostasis modulation. When injected intraperitoneally into mice, BaltPLA₂ (30 µg / 50 µl PBS) makes the plasma incoagulable. In addition, a small dose of the enzyme (1 µg) was able to inhibit about 80% and 45% of platelet aggregation induced by epinephrine (Figure 6A) and ADP (Figure 6B), respectively. Diseases caused by disorders in the blood clotting cascade are of extreme relevance to medicine since they can lead to hypercoagulation and formation of intravascular thrombi which can result in obstruction of blood vessels [45]. Thus, inhibitors of platelet aggregation

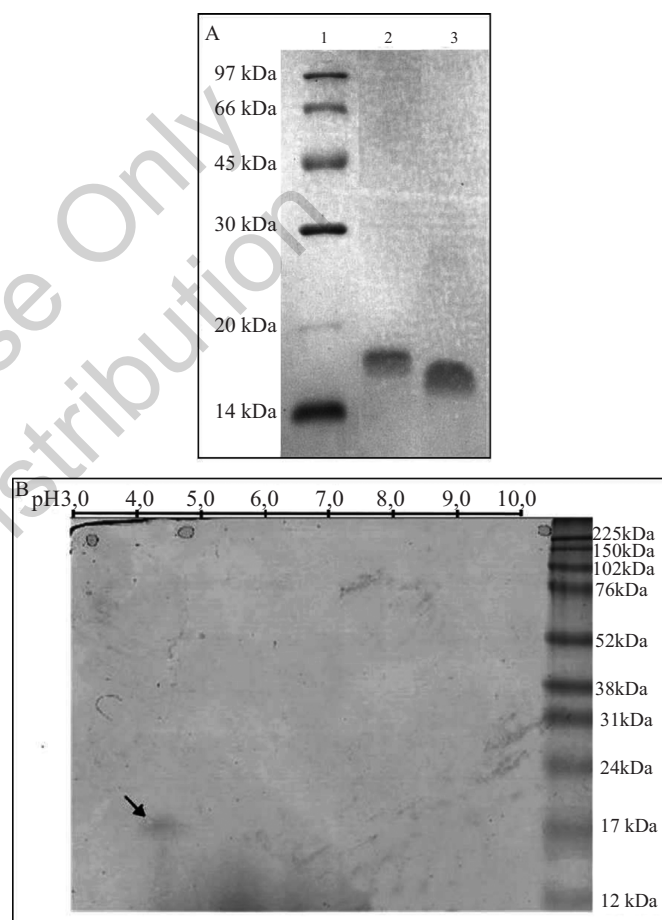


Figure 2. Biochemical characterization of BaltPLA₂. (A) SDS-PAGE (14%): Lane 1: standard proteins, 2: reduced BaltPLA₂, 3: non-reduced BaltPLA₂. (B) Two dimensional electrophoresis of BaltPLA₂: arrows indicate pI of 4.4 and molecular mass around 17 kDa.

are molecules with potential therapeutic use for the development of new anticoagulant agents that may reduce the formation of thrombi.

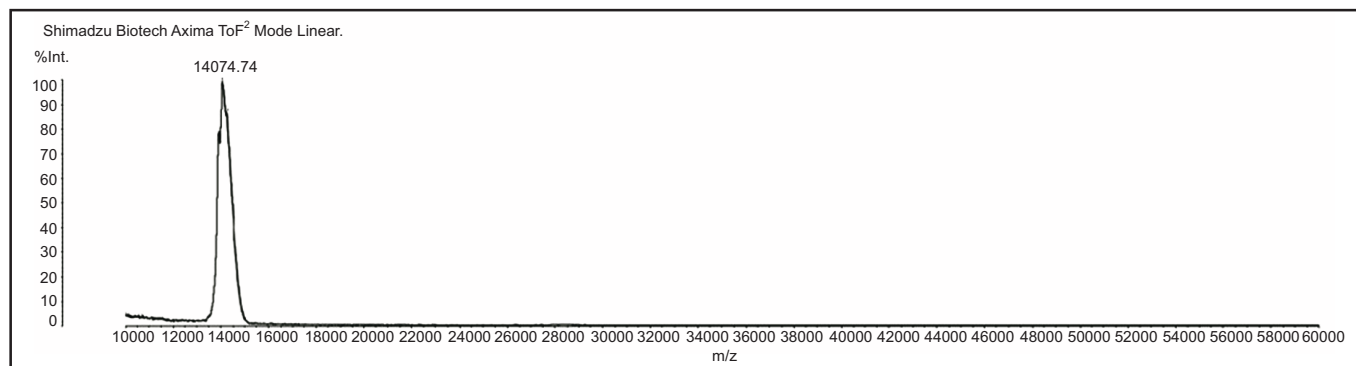


Figure 3. Mass determination of BaltPLA₂. BaltPLA₂ has a high purity and has a molecular mass of 14,074.74 Da.

	Amino acid position	90	100	Identity (%)	Reference
<i>Sistrurus miliarius</i>	ABY77927.1	S Y S W K S G V I I C G E G T P C E K Q I C E C D		100	[72]
<i>Crotalus cerberus</i>	ANN23929.1	S Y S W K S G V I I C G E G T P C E K Q I C E C D		100	[73]
<i>Crotalus molossus</i>	ANN23924.1	S Y S W K S G V I I C G E G T P C E K Q I C E C D		100	[73]
<i>Bothriechis schlegelii</i>	Q6EER4.1	S Y S W K S G V I I C G E G T P C E K Q I C E C D		100	[74]
<i>Cerrophidion godmani</i>	Q6EER5.1	S Y S W R S G V I I C G E G T P C E K Q I C E C D		100	[74]
<i>Bothrops asper</i>	P20474.2	S Y S W K S G V I T C G E G T P C E K Q I C E C D		93	[75]
<i>Bothrops atrox</i>	JAV01878.1	S Y S W K S G V I T C G E G T P C E K Q I C E C D		93	[76]
<i>Bothrops alternatus</i>	BaltPLA ₂	S G V I I C G E G T P C E K			Present work

Figure 4. Comparison of the amino acid partial sequence of BaltPLA₂ with other svPLA₂. BaltPLA₂ showed high homology with different PLA₂s from Viperidae family but not with *B. alternatus* proteins sequences GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/submit/>). Conserved residues are shown in black frames.

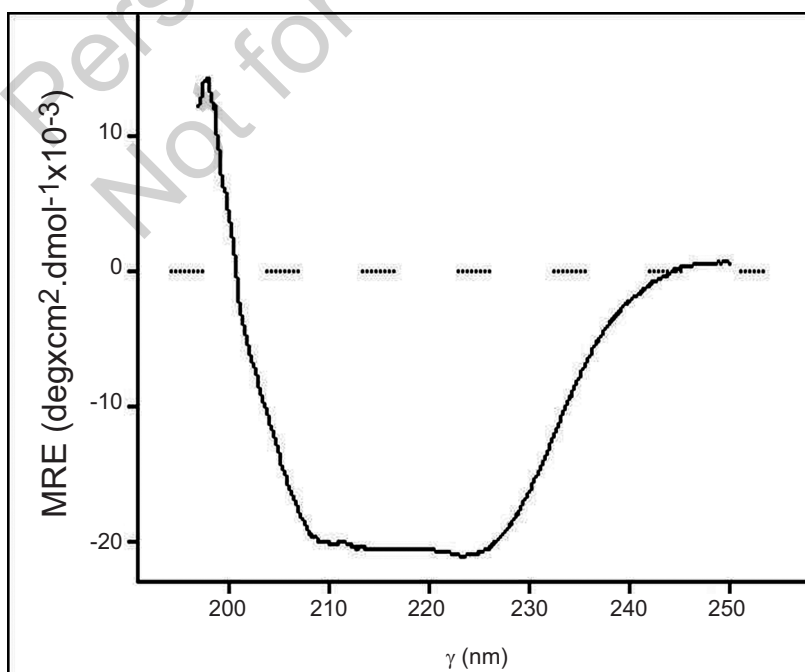


Figure 5. CD spectrum of BaltPLA₂. The spectrum was obtained by spectroscopy in the "far-UV" spectral region (190-250 nm), showing characteristic peaks of alpha helical structures in 195, 208 and 222nm".

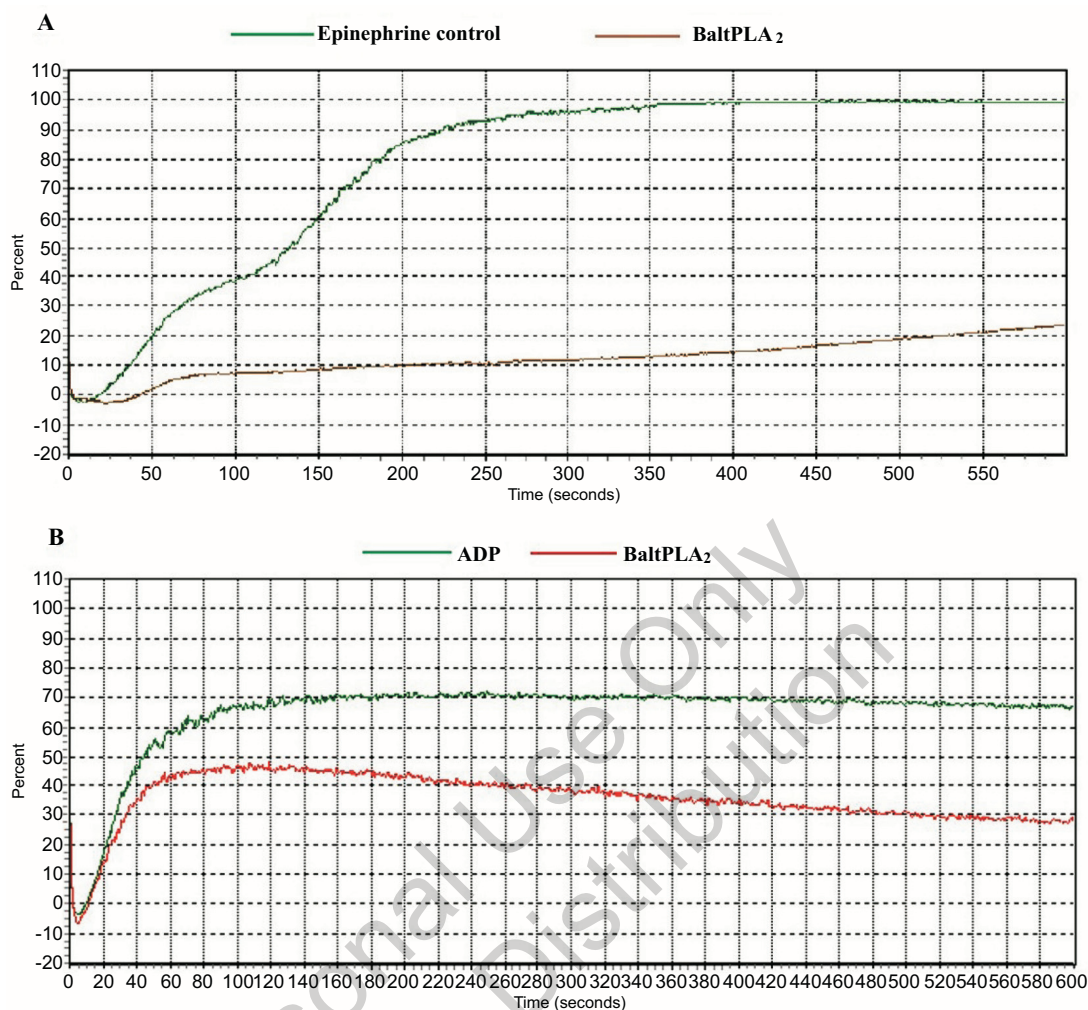


Figure 6. Effect of BaltPLA₂ on platelet aggregation. BaltPLA₂ (1 μ g) was able to inhibit about 80% and 45% of platelet aggregation induced by (A) epinephrine and (B) ADP, respectively. Platelet aggregation was recorded for 10 min in an AggRAM platelet aggregation system with four-channel. Control experiments were performed in the absence of BaltPLA₂.

A number of studies have described the platelet anti-platelet activity of svPLA₂s. These enzymes are capable of cleaving membrane phospholipids and release arachidonic acid. It is known that arachidonic acid metabolites can activate (thromboxane A₂) or inhibit (prostaglandins) platelet aggregation. In addition, aggregation may be inhibited due to effects of hydrolysis of by products of arachidonic acid [46, 47]. On the other hand, Teixeira *et al.*, [41] demonstrated that a synthetic peptide from C-terminal region of the enzyme BpirPLA₂-I maintained the antiplatelet activity. This finding highlights the importance of this region in the inhibition of svPLA₂s-induced platelet aggregation.

The action of PLA₂s on muscle cells is also important for the understanding of myonecrosis and inflammatory effects after bothropic envenomation [48-50]. The recruitment of inflammatory cells at the site of the snakebite can be explained by the release of pro-inflammatory mediators such as cytokines and eicosanoids (thromboxane, leukotrienes and prostaglandins) [32, 41, 51-53]. When injected into the gastrocnemius muscle of mice, BaltPLA₂ (30 μ g

/ 50 μ L) caused myonecrosis with evident inflammatory infiltrate (Figure 7B), compared with the control (Figure 7A). In this work, we also investigated the ability of BaltPLA₂ to induce the production of cytokines. Our results showed that the enzyme, when incubated in culture of murine macrophages for 24 hours, was able to raise the levels of both pro-inflammatory cytokines IL-12 (Figure 8A) and TNF- α (Figure 8B). Different concentrations of BaltPLA₂ (1.5, 7.0 and 15 μ g / ml) were able to induce practically the same increases in IL-12 level (310, 363 and 287 pg / mL, respectively). However, the increases in TNF- α levels were dose dependent of the enzyme (77, 127 and 250 pg / ml, respectively). On the other hand, the same concentrations of enzyme were also able to induce the increase of the anti-inflammatory cytokine IL-10 (174, 157 and 101 pg / mL, respectively) (Figure 8C). However, the increase of anti-inflammatory cytokine levels was about 3-fold lower than increases in pro-inflammatory cytokine levels. For this reason, we suggest that BaltPLA₂ has a pro-inflammatory action.

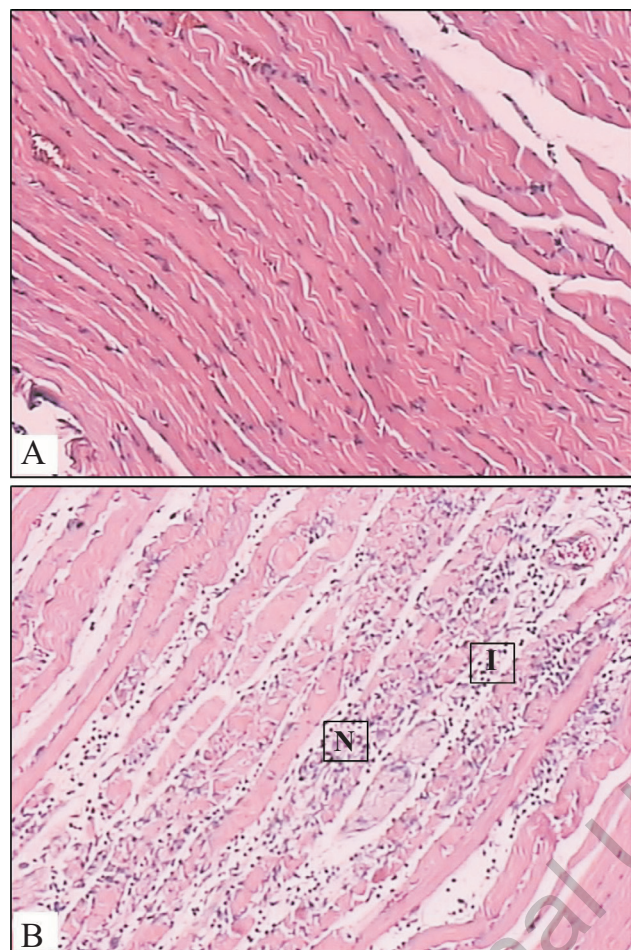


Figure 7. Histopathological analysis of myonecrosis induced by BaltPLA₂. Light micrographs of sections of mouse gastrocnemius muscle 24 h after injection of 30 µg BaltPLA₂, dissolved in 50 µL saline, stained with hematoxylin-eosin, 100 x magnification. (A) Control mice were injected with saline alone: normal integral fibers are observable. (B) BaltPLA₂: notice the presence of Necrosis (N) and an Inflammatory Infiltrate (I).

The mechanism of induction of inflammatory response by svPLA₂ involves the release of lipid mediators due to its catalytic activity [54]. Studies on macrophage culture have demonstrated the ability of these toxins to induce the expression of cyclooxygenase-2 (COX-2) and prostaglandin E2 (PGE2) [55], with TLR2 / MyD88 receptors being possible targets of these lipid mediators [56]. However, the mechanism of induction of cytokine production caused by svPLA₂s is not well elucidated. Other studies have also reported the ability of svPLA₂ to stimulate the production of pro-inflammatory proteins, including IL-12 and TNF-α [32, 57, 58]. There are studies that show that the increase of levels of TNF-α caused by bothropic PLA₂ is related to the elevation of the levels of reactive species of oxygen [59, 60]. Other two PLA₂s isolated from *B. alternatus* snake venom induce the production of superoxide in macrophages independently of their enzymatic activity through

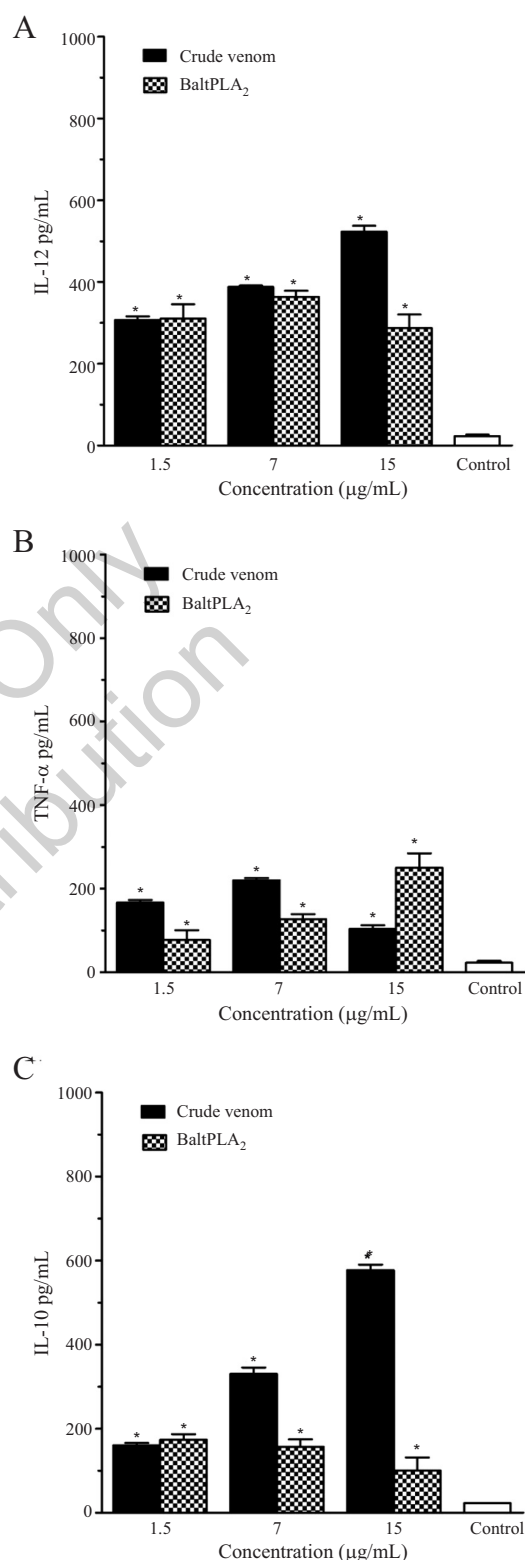


Figure 8. Cytokines production in macrophages stimulated with *B. alternatus* crude venom and BaltPLA₂. Increments in (A) IL-12, (B) TNF-α and (C) IL-10 levels were evaluated 24 h after incubation of macrophages culture with different concentrations of crude venom or BaltPLA₂. Control wells were cultivated in the presence of culture medium alone (RPMI). Each value is the mean ± SD of 3 tests. * P < 0.05, compared with control.

the activation of NADPH oxidase by the signaling pathway of protein kinase C (PKC) [34]. Otherwise, the increase in the levels of IL-10 induced by BaltPLA₂ may be associated with a system of anti-regulation of an initial inflammatory process, as already reported in a study with the *B. brunatus* snake venom [61]. Therefore, more studies are needed to better elucidate the mechanisms that induce the production of cytokines by BaltPLA₂.

In summary, our study demonstrates that BaltPLA₂ is a new acid PLA₂ isolated from the *B. alternatus* snake venom with myonecrotic, pro-inflammatory and antiplatelet activities. The study of svPLA₂ contributes significantly to the understanding of the pathophysiological effects of bothropic envenomation and can be an important tool in the development of therapeutic alternatives in haemostasis disorders.

ETHICAL APPROVAL AND CONSENT TO PARTICIPATE

All the protocols used in this work involving animals were approved by the Ethics Committee on Animal Use (CEUA) of the Federal University of Uberlândia (Protocol Number 108/12). The protocol for the collection was submitted and approved by the Committee of Ethics in Research with Human (CEP) of the Federal University of Uberlândia (Protocol Number 1,627,982 / 2016).

HUMAN AND ANIMAL RIGHTS

Only human blood samples were used. The reported experiments on animals, were in accordance with the guidelines of the Federal University of Uberlândia, Brazil.

CONSENT FOR PUBLICATION

Human blood was obtained through donation from volunteers.

CONFLICT OF INTERESTS

The authors declare that there is no conflict of interests.

ACKNOWLEDGEMENTS

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

REFERENCES

- Vélez, S.M.; Salazar, M.; Acosta de Patiño, H.; Gómez, L.; Rodríguez, A.; Correa, D.; Saldaña, J.; Navarro, D.; Lomonte, B.; Otero-Patiño, R.; Gutiérrez, J.M. Geographical variability of the venoms of four populations of *Bothrops asper* from Panama: Toxicological analysis and neutralization by a polyvalent antivenom. *Toxicon*, **2017**, *132*, 55-61.
- Zelanis, A.; Andrade-Silva, D.; Rocha, M.M.; Furtado, M.F.; Serrano, S.M.T.; Junqueira-de-Azevedo, I.L.M.; Ho, P.L. A Transcriptomic view of the proteome variability of newborn and adult *Bothrops jararaca* snake venoms. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, **2012**, *6*(3), 15-18.
- Chippaux, J.P.; Williams, V.; White, J. Snake venom variability: Methods of study, results and interpretation. *Toxicon*, **1991**, *29*(11), 1279-1303.
- Menezes, M.C.; Furtado, M.F.; Travaglia-Cardoso, S.R.; Camargo, A.C.M.; Serrano, S.M.T. Sex-based individual variation of snake venom proteome among eighteen *Bothrops jararaca* siblings. *Toxicon*, **2006**, *47*(3), 304-312.
- Matias, M.S.; de Sousa, B.B.; da Cunha Pereira, D.F.; Dias, E.H.V.; Mamede, C.C.N.; de Queiroz, M.R.; Silva, A.C.A.; Dantas, N.O.; Soares, A.M.; de Oliveira Costa, J.; de Oliveira, F. BaltDC: Purification, characterization and infrared spectroscopy of an antiplatelet DC protein isolated from *Bothrops alternatus* snake venom. *J. Venom. Anim. Toxins Incl. Trop. Dis.*, **2017**, *23*(1), 1-8.
- Setúbal, S.S.; Pontes, A.S.; Furtado, J.L.; Xavier, C.V.; Silva, F.L.; Kayano, A.M.; Izidoro, L.F.M.; Soares, A.M.; Calderon, L.A.; Stábeli, R.G.; Zuliani, J.P. Action of two phospholipases A₂ purified from *Bothrops alternatus* snake venom on macrophages. *Biochemistry (Mosc.)*, **2013**, *78*(2), 194-203.
- Izidoro, L.F.M.; Ribeiro, M.C.; Souza, G.R.L.; Sant'Ana, C.D.; Hamaguchi, A.; Homs-Brandeburgo, M.I.; Goulart, L.R.; Belebony, R.O.; Nomizo, A.; Sampaio, S.V.; Soares, A.M.; Rodrigues, V.M. Biochemical and functional characterization of an L-amino acid oxidase isolated from *Bothrops pirajai* snake venom. *Bioorganic Med. Chem.*, **2006**, *14*(20), 7034-7043.
- Paula, R.D.; Castro, H.; Rodrigues, C.; Melo, P.; Fuly, A. Structural and pharmacological features of phospholipases A₂ from snake venoms. *Protein Pept. Lett.*, **2009**, *16*(8), 899-907.
- Gutiérrez, J.M.; Lomonte, B. phospholipase A₂ myotoxins from *Bothrops* snake venoms. **1995**, *33*(11), 1405-1424.
- Kini, R.M. Excitement ahead: Structure, Function and mechanism of snake venom phospholipase A₂ enzymes. *Toxicon*, **2003**, *42*(8), 827-840.
- Zychar, B.C.; Dale, C.S.; Demarchi, D.S.; Gonçalves, L.R.C. Contribution of metalloproteases, serine proteases and phospholipases A₂ to the inflammatory reaction induced by *Bothrops jararaca* crude venom in mice. *Toxicon*, **2010**, *55*(2-3), 227-234.
- Burke, J.E.; Dennis, E.A. phospholipase A₂ Structure/function, mechanism, and signaling. *J. Lipid Res.*, **2009**, *50*(Supplement), S237-S242.
- Schaloske, R.H.; Dennis, E.A. The phospholipase A₂ superfamily and its group numbering system. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids*, **2006**, *1761*(11), 1246-1259.
- Quintero, A.; Soares, A.M. Functional and structural characterization of phospholipases A₂ isolated from *Bothrops asper* snake venom in Panamá. *J. Venom Anim. Toxins Incl. Trop. Dis.*, **2010**, *16*(4), 9199.
- Ami, R.; Ward, R. phospholipase A₂: A structural review. *Toxicon*, **1996**, *34*(8), 827-841.
- Lomonte, B.; Rangel, J. Snake venom Lys49 myotoxins: From phospholipases A₂ to non-enzymatic membrane disruptors. *Toxicon*, **2012**, *60*, 520-530.
- Barbosa, P.S.F.; Martins, A.M.C.; Havt, A.; Toyama, D.O.; Evangelista, J.S. A.M.; Ferreira, D.P.P.; Joazeiro, P.P.; Beriam, L.O.S.; Toyama, M.H.; Fonteles, M.C.; Monteiro, H.S. Renal and antibacterial effects induced by myotoxin I and II isolated from *Bothrops jararacussu* venom. *Toxicon*, **2005**, *46*, 376-386.
- Nunes, D.; Figueira, M.; Lopes, D.; De Souza, D.; Izidoro, L.; Ferro, E.; Yoneyama, K. BnSP-7 toxin, a basic phospholipase A₂ from *Bothrops pauloensis* snake venom, interferes with proliferation, ultrastructure and infectivity of *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. *Parasitology*, **2013**, *140*(7), 844-854.
- Muller, V.D.; Soares, R.O.; dos Santos-Junior, N.N.; Trabuco, A.C.; Cintra, A.C.; Figueiredo, L.T.; Caliri, A.; Sampaio, S.V.; Aquino, V.H. phospholipase A₂ isolated from the venom of *Crotalus durissus terrificus* inactivates dengue virus and other enveloped viruses by disrupting the viral envelope. *PLoS One*, **2014**, *9*(11), e112351.
- Almeida, J.R.; Lancellotti, M.; Soares, A.M.; Calderon, L.A.; Ramirez, D.; Gonzales, W.; Marangoni, S.; Da Silva, S.L. CoaTx-II, a new dimeric Lys49 phospholipase A₂ from *Crotalus oreganusabyssus* snake venom with bactericidal potential: Insights into its structure and biological roles. *Toxicon*, **2016**, *120*, 147-158.
- Sobrinho, A.J.C.; Kayano, A.M.; Alfonso, J.J.; Gomez, A.F.; Vega, M.C.; Zanchi, F.B.; Moura, L.A.; Vivian, R. Anti-platelet aggregation activity of two novel acidic Asp49-phospholipases A₂

- from *Bothrops brazili* snake venom. *Int. J. Biol. Macromol.*, **2017**, *107*(2018), 1014-1022.
- [22] Chen, M.; Aoki-utsubo, C.; Kameoka, M.; Deng, L.; Terada, Y.; Sato, K.; Koyanagi, Y.; Hijikata, M.; Shindo, K.; Noda, T. Broad-spectrum antiviral agents: Secreted phospholipase A₂ targets viral envelope lipid bilayers derived from the endoplasmic reticulum membrane. *Sci. Rep.*, **2017**, *7*(1), 15931.
- [23] Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, **1976**, *72*(1-2), 248-254.
- [24] Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **1970**, *227*, 680-685.
- [25] Queiroz, M.R.De; Mamede, C.C.N.; Fonseca, K.C.; Morais, N.C.G.De; Sousa, B.B.De; Santos-filho, N.A.; Beletti, M.E.; Arantes, E.C.; Stanziola, L.; Oliveira, F.De. Rapid purification of a new P-I class metalloproteinase from *Bothrops moojeni* venom with anti-platelet activity. *Biomed. Res. Int.*, **2014**, *2014*, 352420.
- [26] Oliveira, C.Z.; Santos-Filho, N.A.; Menaldo, D.L.; Boldrini-Franca, J.; Giglio, J. R.; Calderon, L.A.; Stabeli, R.G.; Rodrigues, F.H.S.; Tasic, L.; da Silva, S.L.; Soares, A.M. Structural and functional characterization of a γ -type phospholipase A₂ inhibitor from *Bothrops jararacussu* snake plasma. *Curr. Top. Med. Chem.*, **2011**, *11*, 2509-2519.
- [27] Palacio, T.Z.; Santos-filho, N.A.; Cesar, J.; Ferreira, R.S.; Barraviera, B.; Sampaio, S.V. Isolation and characterization of a novel metalloprotease inhibitor from *Bothrops alternatus* snake serum. *Int. J. Biol. Macromol.*, **2017**, *98*, 436-446.
- [28] Gutiérrez, J.M.; Avila, C.; Rojas, E.; Cerdas, L. An alternative *in vitro* method for testing the potency of the polyvalent antivenom produced in Costa Rica. *Toxicol.*, **1988**, *26*(4), 411-413.
- [29] Gené, J.A.; Roy, A.; Rojas, G.; Gutiérrez, J.M.; Cerdas, L. Comparative study on coagulant, defibrinating, fibrinolytic and fibrinogenolytic activities of Costa Rican crotaline snake venoms and their neutralization by a polyvalent antivenom. *Toxicol.*, **1989**, *27*(8), 841-848.
- [30] Mamede, C.C.N.; Queiroz, M.R.D.; Fonseca, K.C.; Morais, N.C.G.D.; Filho, S.A.G.; Beletti, M.E.; Stanziola, L.; Oliveira, F.D. Histological and ultrastructural analyses of muscle damage induced by a myotoxin isolated from *Bothrops alternatus* snake venom. *Protein Pept. Lett.*, **2012**, *20*(2), 192-199.
- [31] Santos-Filho, N.A.; Silveira, L.B.; Oliveira, C.Z.; Bernardes, C.P.; Menaldo, D.L.; Fuly, A.L.; Arantes, E.C.; Sampaio, S.V.; Mamede, C.C.N.; Beletti, M.E.; de Oliveira, F.; Soares, A.M. A new acidic myotoxic, anti-platelet and prostaglandin I₂ inductor phospholipase A₂ isolated from *Bothrops moojeni* snake venom. *Toxicol.*, **2008**, *52*(8), 908-917.
- [32] Nunes, D.C.O.; Rodrigues, R.S.; Lucena, M.N.; Cologna, C.T.; Oliveira, A.C.S.; Hamaguchi, A.; Homs-Brandeburgo, M.I.; Arantes, E.C.; Teixeira, D.N.S.; Ueira- Vieira, C.; Rodrigues, V.M. Isolation and functional characterization of proinflammatory acidic phospholipase A₂ from *Bothrops leucurus* snake venom. *Comp. Biochem. Physiol. - C Toxicol. Pharmacol.*, **2011**, *154*(3), 226-233.
- [33] Ferreira, F.B.; Sérgio, M.; Gomes, R.; Lorena, D.; de Souza, N.; Rodrigues, R.S.; Aparecida, K.; Yoneyama, G. Molecular cloning and pharmacological properties of na acidic PLA₂ from *Bothrops pauloensis* snake venom. *Toxins*, **2013**, *180*, 2403-2419.
- [34] Setúbal, S.S.; Pontes, A.S.; Furtado, J.L.; Xavier, C.V.; Silva, F.L.; Kayano, A.M.; Izidoro, L.F.M.; Soares, A.M.; Calderon, L.A.; Stábeli, R.G.; Zuliiani, J.P. Action of two phospholipases A₂ purified from *Bothrops alternatus* snake venom on macrophages. *Biochemistry*, **2013**, *78*(2), 194-203.
- [35] Quintero, A.; Soares, A.M. Functional and structural characterization of phospholipases A₂ isolated from *Bothrops Asper* snake venom in Panamá. *J. Venom Anim. Toxins Incl. Trop. Dis.*, **2010**, *16*(4), 9199.
- [36] Higuchi, D.A.; Barbosa, C.M.; Bincoletto, C.; Chagas, J.R.; Magalhaes, A. Purification and partial characterization of two phospholipases A₂ from *Bothrops leucurus* (White-Tailed-Jararaca) snake venom. *Biochemistry*, **2007**, *89*, 319-328.
- [37] Torres, A.F.C.; Dantas, R.T.; Toyama, M.H.; Filho, E.D.; Zara, F.J.; Rodrigues de Queiroz, M.G.; Pinto Nogueira, N.A.; Rosa de Oliveira, M.; de Oliveira Toyama, D.; Monteiro, H.S.; Martins, A.M. Antibacterial and antiparasitic effects of *Bothrops marajoensis* venom and its fractions: Phospholipase A₂ and L-amino acid oxidase. *Toxicol.*, **2010**, *55*(4), 795-804.
- [38] Grabner, A.N.; Alfonso, J.; Kayano, A.M.; Moreira-dill, L.S.; Paula, A.; Santos, D.A.; Caldeira, C.A.S.; Sobrinho, J.C.; Gómez, A.; Grabner, F.P.; Cardoso, F.F.; Zuliiani, J.P.; Fontes, M.R.M.; Pimenta, D.C.; Gómez, C.V.; Teles, C.B.G.; Soares, A.M.; Calderon, L.A. BmajPLA₂-II, a basic Lys49-phospholipase A₂ homologue from *Bothrops marajoensis* snake venom with parasitocidal potential. *Int. J. Biol. Macromol.*, **2017**, *102*, 571-581.
- [39] Oliveira, C.Z.; Menaldo, D.L.; Marcussi, S.; Santos-Filho, N.A.; Silveira, L.B.; Boldrini-França, J.; Rodrigues, V.M.; Soares, A.M. An α -type phospholipase A₂ inhibitor from *Bothrops jararacussu* snake plasma: Structural and functional characterization. *Biochimie*, **2008**, *90*(10), 1506-1514.
- [40] Scott, D.L.; Achari, A.; Vidal, J.C.; Sigler, P.B. Crystallographic and biochemical studies of the (Inactive) Lys-49 phospholipase A₂ from the venom of *Agkistridon piscivorus piscivorus*. *J. Biol. Chem.*, **1992**, *267*(31), 22645-22657.
- [41] Teixeira, S.S.; Silveira, L.B.; Da Silva, F.M.N.; Marchi-Salvador, D.P.; Silva, F.P.; Izidoro, L.F.M.; Fuly, A.L.; Juliano, M.A.; Dos Santos, C.R.; Murakami, M.T.; Sampaio, S.V.; da Silva, S.L.; Soares, A.M. Molecular characterization of an acidic phospholipase A₂(2) from *Bothrops pirajai* snake venom: Synthetic C-terminal peptide identifies its antiplatelet region. *Arch. Toxicol.*, **2011**, *85*(10), 1219-1233.
- [42] Toyama, M.H.; Costa, P.D.; Novello, J.C.; de Oliveira, B.; Giglio, J.R.; Da Cruz- Höfling, M.A.; Marangoni, S. Purification and amino acid sequence of MP-III 4R D49 phospholipase A₂ from *Bothrops pirajai* snake venom, a toxin with moderate PLA₂ and anticoagulant activities and high myotoxic activity. *J. Protein Chem.*, **1999**, *18*(3), 371-378.
- [43] Bonfim, V.L.; Toyama, M.H.; Novello, J.C.; Hyslop, S.; Oliveira, C.R.B.; Rodrigues-Simioni, L.; Marangoni, S. Isolation and enzymatic characterization of a basic phospholipase A₂ from *Bothrops jararacussu* snake venom. *J. Protein Chem.*, **2001**, *20*(3), 239-245.
- [44] Santos-Filho, N.A.; Silveira, L.B.; Oliveira, C.Z.; Bernardes, C.P.; Menaldo, D.L.; Fuly, A.L.; Arantes, E.C.; Sampaio, S.V.; Mamede, C.C.N.; Beletti, M.E.; de Oliveira, F.; Soares, A.M. A new acidic myotoxic, anti-platelet and prostaglandin I₂ inductor phospholipase A₂ isolated from *Bothrops moojeni* snake venom. *Toxicol.*, **2008**, *52*(8), 908-917.
- [45] Heit, J.A. Epidemiology of venous thromboembolism. *Nat. Rev. Cardiol.*, **2015**, *12*, 464-474.
- [46] Lu, Q.; Clemetson, J.M.; Clemetson, K.J. Snake venoms and hemostasis. *J. Thromb. Haemost.*, **2005**, *3*(8), 1791-1799.
- [47] Fuly, A.L.; Calil-Elias, S.; Martinez, A.M.B.; Melo, P.A.; Guimarães, J.A. Myotoxicity induced by an acidic Asp-49 phospholipase A₂ isolated from *Lachesis muta* snake venom: Comparison with lysophosphatidylcholine. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **2003**, *35*(10), 1470-1481.
- [48] Dennis, E.A.; Cao, J.; Hsu, Y.H.; Magrioti, V.; Kokotos, G. phospholipase A₂ enzymes: Physical structure, biological function, disease implication, chemical inhibition, and therapeutic intervention. *Chem. Rev.*, **2011**, *111*(10), 6130-6185.
- [49] Harris, J.B. Myotoxic phospholipases A₂ and the regeneration of skeletal muscles. *Toxicol.*, **2003**, *42*(8), 933-945.
- [50] Gutiérrez, J.M.; Rucavado, A.; Chaves, F.; Diaz, C.; Escalante, T. Experimental pathology of local tissue damage induced by *Bothrops asper* snake venom. *Toxicol.*, **2009**, *54*(7), 958-975.
- [51] Moreira, V.; Gutiérrez, J.M.; Amaral, R.B.; Zamané, S.R.; Teixeira, C.F.P. Effects of *Bothrops asper* snake venom on the expression of cyclooxygenases and production of prostaglandins by peritoneal leukocytes *in vivo*, and by isolated neutrophils and macrophages *in vitro*. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fat. Acids.*, **2009**, *80*(2-3), 107-114.
- [52] Moreira, V.; Dos-Santos, M.C.; Nascimento, N.G.; da Silva, H.B.; Fernandes, C.M.; D'Império Lima, M.R.; Teixeira, C. Local inflammatory events induced by *Bothrops atrox* snake venom and the release of distinct classes of inflammatory mediators. *Toxicol.*, **2012**, *60*(1), 12-20.
- [53] Voronov, E.; Apte, R.N.; Sofer, S. The systemic inflammatory response syndrome related to the release of cytokines following severe envenomation. *J. Venom Anim. Toxins*, **1999**, *5*(1), 5-33.
- [54] Teixeira, C.F.P.; Landucci, E.C.T.; Antunes, E.; Chacur, M.; Cury, Y. Inflammatory effects of snake venom myotoxic phospholipases A₂. *Toxicol.*, **2003**, *42*(8), 947-962.

- [55] Moreira, V.; Lomonte, B.; Vinolo, M.A.R.; Curi, R.; Gutiérrez, J.M.; Teixeira, C. An Asp49 phospholipase A₂ from snake venom induces cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin E₂ production via activation of NF-κB, P38MAPK, and PKC in macrophages. *Mediators Inflamm.*, **2014**, 2014, 105879.
- [56] Leiguez, E.; Giannotti, K.C.; Moreira, V.; Matsubara, M.H.; Gutiérrez, J.M.; Lomonte, B.; Rodríguez, J.P.; Balsinde, J.; Teixeira, C. Critical role of TLR2 and MyD88 for functional response of macrophages to a group IIA-secreted phospholipase A₂ from snake venom. *PLoS One*, **2014**, 9(4), 105879.
- [57] Delafontaine, M.; Villas-Boas, I.M.; Mathieu, L.; Josset, P.; Blomet, J.; Tambourgi, D.V. Enzymatic and pro-inflammatory activities of *Bothrops lanceolatus* venom: Relevance for envenomation. *Toxins(Basel)*, **2017**, 9(8), 1-19.
- [58] Wei, J.F.; Li, T.; Wei, X.L.; Sun, Q.Y.; Yang, F.M.; Chen, Q.Y.; Wang, W.Y.; Xiong, Y.L.; He, S.H. Purification, characterization and cytokine release function of a novel Arg-49 phospholipase A₂ from the venom of *Protobothrops mucrosquamatus*. *Biochimie*, **2006**, 88(10), 1331-1342.
- [59] Furtado, J.L.; Oliveira, G.A.; Pontes, A.S.; Setúbal, S.S.; Xavier, C.V.; Lacouth-silva, F.; Lima, B.F.; Zaqueo, K.D.; Kayano, A.M.; Calderon, L.A.; Stábeli, R.G.; Soares, A.M.; Zuliani, J.P. Activation of J77A.1 macrophages by three phospholipases A₂ isolated from *Bothrops atrox* snake venom. *Biomed. Res. Int.*, **2014**, 2014, 1-13.
- [60] Zuliani, J.P.; Gutiérrez, J.M.; Casais, E.; Silva, L.L.; Sampaio, S.C.; Lomonte, B.; Pereira Teixeira, C.D.F. Activation of cellular functions in macrophages by venom secretory Asp-49 and Lys-49 phospholipases A₂. *Toxicon*, **2005**, 46(5), 523-532.
- [61] Echeverría, S.; Leiguez, E.; Guijas, C.; do Nascimento, N.G.; Acosta, O.; Teixeira, C.; Leiva, L.C.; Rodríguez, J.P. evaluation of pro-inflammatory events induced by *Bothrops alternatus* snake venom. *Chem. Biol. Interact.*, **2018**, 281(2018), 24-31.

Personal Use Only
Not for Distribution



In vitro tracking of phospholipase A₂ from snake venom conjugated with magic-sized quantum dots

Edigar H.V. Dias^a, Déborah F.C. Pereira^a, Bruna B. de Sousa^{a,d}, Mariana S. Matias^a, Mayara R. de Queiroz^{a,e}, Fernanda M. Santiago^b, Anielle C.A. Silva^c, Noelio O. Dantas^c, Norival Alves Santos-Filho^d, Fábio de Oliveira^{b,e,*}

^a Instituto de Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG, Brazil

^b Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG, Brazil

^c Instituto de Física, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG, Brazil

^d Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, SP, Brazil

^e Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Nano-Biofarmacêutica (N-Biofar), Belo Horizonte, MG, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 18 May 2018

Received in revised form 20 August 2018

Accepted 27 October 2018

Available online 29 October 2018

Keywords:

Luminescent probe

Phospholipase A₂

Magic-sized quantum dot

ABSTRACT

Phospholipases A₂ represent a family of enzymes with important application in medicine. However, direct tracking is difficult due to the absence of a stable, effective and specific marker for these enzymes. Magic-sized quantum dots (MSQDs) are inorganic semiconducting nanocrystals with unique physical properties. They have the ability to conjugate to proteins, making them excellent markers for biological systems. In this work, we labelled phospholipase A₂ from *Bothrops alternatus* snake venom with Cadmium selenide (CdSe)/cadmium sulphate (CdS) MSQDs—a biocompatible and luminescent probe—. Bioconjugation was confirmed using infrared spectra and fluorescence microscopy, which demonstrated that the CdSe/CdS MSQDs interact with phospholipase A₂ without interfering with its activity. This probe may be an important tool for the elucidation of many biological mechanisms, because it allows the pathway of phospholipase A₂ to be tracked from its entry through the plasma membrane until its incorporation into the nucleus of myoblasts.

© 2018 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Phospholipase A₂ enzymes (PLA₂) are commonly found in mammalian tissues as well as in arachnid, insect and snake venom [1]. This superfamily consists of enzymes that catalyse the hydrolysis of the sn-2 position of membrane glycerophospholipids to liberate arachidonic acid, a precursor of eicosanoids including prostaglandins and leukotrienes, which may mediate several steps of the inflammatory process [2]. Inside the body of the victim, PLA₂s from snake venom induce either direct or indirect pathophysiological effects including neurotoxic, cardiotoxic, anticoagulant, oedematogenic, myotoxic and inflammatory activities [3–8]. In spite of their pathophysiological effects, PLA₂s from snake venom also have therapeutic potential due to their antiplatelet aggregation, anti-angiogenesis, antiparasitic, antitumor, bactericidal and hypotensive effects [6,9–12].

Magic-sized quantum dots (MSQDs) are a category of quantum dot that exhibit thermodynamically stable structures, well-defined numbers of atoms (fixed size) and broad emission spectra [13]. The ability of MSQDs to be conjugated to various biomolecules makes them excellent probes for bioimaging applications [14]. Recently, it has been

demonstrated that CdSe/CdS MSQDs are excellent materials for biological applications due to their physical and biological properties being much more interesting than those of traditional QDs [15]. Specifically, CdSe/CdS MSQDs have higher fluorescence quantum efficiency than traditional QDs [16]. Furthermore, the biocompatibility of CdSe/CdS MSQDs can be altered by varying the density of cadmium ions adsorbed onto their surfaces [17,18].

Kethineedi et al. [19] reported the fabrication and characterisation of liposome-encapsulated QD-fluorescence resonance energy transfer (FRET)-based probes for indirect detection of PLA₂ activity. Li et al. [20] have also developed a similar methodology using QD cluster-loaded phospholipid micelles. However, there are no reports in the literature to date regarding the use of QDs as luminescent probes for the direct tracking of PLA₂ enzymes within cells. Thus, the objective of this work was to verify the conjugation of CdSe/CdS MSQDs with a PLA₂ from snake venom, a valid its use as a new luminescent probe for this class of enzyme.

2. Materials and methods

2.1. Animals

The Balb/c mice (20–25 g) used for antibody production in this study were obtained from the Centro de Bioterismo e Experimentação Animal (CEBEA) of the Universidade Federal de Uberlândia, and kept in

* Corresponding author at: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG, Brazil.

E-mail address: fabio@ufu.br (F. de Oliveira).

controlled conditions of temperature (22 ± 2 °C), humidity (60–70%) and light/dark cycles (12 h), with free access to food and water.

2.2. BaltPLA₂ enzyme

The PLA₂ preparations used in this work were previously isolated in our laboratory from the venom of *Bothrops alternatus*, and were denominated BaltPLA₂. The concentrations of protein solutions were determined by Bradford assay [21].

2.3. Anti-BaltPLA₂ antibody production

Female Balb/c mice were immunised three times with BaltPLA₂ (25 µg/mL) or phosphate buffer saline (PBS) as a negative control. Intraperitoneal immunisations were performed at 15-day intervals, using 10 mg/mL aluminium hydroxide gel (alum, InvivoGen, CA) as an adjuvant. Blood was collected and incubated for 1 h at 37 °C, then centrifuged at 1000 ×g to obtain the serum.

2.4. Synthesis and physical characterisation of CdSe/CdS MSQDs

Synthesis of CdSe/CdS MSQDs was carried out in aqueous colloidal solution as described by Silva et al., with minor modifications [22]. Briefly, an NaHSe solution with 1 mmol Se and 2 mmol NaBH₄ was prepared in a three-necked flask containing 40 mL ultrapure water under an inert atmosphere of argon. A second solution was prepared containing 4 mmol Cd(ClO₄)₂·6H₂O, 3 mmol 1-thioglycerol and 10 mL ultrapure water. The CdSe1-xSx alloy and the CdS shell around CdSe and MSQDs were developed according to previously described methodology [13,17].

Optical absorption spectra were recorded at room temperature using a double-beam UV-VIS-NIR spectrophotometer (UV-3600, Shimadzu, Japan) at a spectral resolution of 1 nm. Fluorescence spectra were recorded at 380 nm with a Cary Eclipse spectrophotometer (Varian, Inc.) using a xenon lamp as the excitation source. Atomic force microscopy (AFM) images of the dot samples were recorded at room temperature using a scanning probe microscope (SPM-9600, Shimadzu).

2.5. Bioconjugation of CdSe/CdS MSQDs and BaltPLA₂

The synthesised CdSe/CdS MSQDs and BaltPLA₂ were dissolved in sterile water at a ratio of 2:1 (w/w) and incubated at room temperature for 15 min without any further treatment.

2.6. Reversed-phase chromatography

Aqueous solutions of BaltPLA₂ (200 µg) were incubated for 15 min with different amounts of CdSe/CdS MSQDs (20, 200, and 400 µg) dissolved in solvent A (0.1 trifluoroacetic acid), and the resulting solution subjected to reverse-phase chromatography in a C2/C18 column (4.6 × 100 mm) using the ÄKTApurifier HPLC system (GE Healthcare, Uppsala, Sweden). The column was equilibrated with solvent A and eluted using a concentration gradient from 0 to 100% toward solvent B (0.1% trifluoroacetic acid in acetonitrile) with a flow rate of 0.5 mL/min at room temperature. Absorbance was monitored at 280 nm and 1 mL fractions were collected.

2.7. Infrared spectroscopy

The interaction of CdSe/CdS MSQDs (2 µg/µL) with BaltPLA₂ (1 µg/µL) was investigated using infrared (IR) spectroscopy of aqueous solutions at room temperature using a Shimadzu Fourier transform IR (FT-IR) spectrophotometer (Vertex 70, Massachusetts, United States) in the spectral range 830–4000 cm⁻¹ via a coupled attenuated total reflectance (ATR) element.

2.8. Circular dichroism spectroscopy

Spectra were recorded from 195 to 260 nm with a JASCO J-815 circular dichroism (CD) spectrophotometer (Great Dunmow, United Kingdom) in 1 mm path length quartz cuvettes at room temperature. To investigate conformational changes, the spectra of the bioconjugate and pure BaltPLA₂ were recorded in an aqueous buffer of 0.01 M Tris HCl, pH 7.5, at a final concentration of 0.5 mg/mL. Spectra were typically recorded as an average of 15 scans, obtained in millidegrees and converted to molar residue ellipticity using the following equation: $[\theta]_{\text{mrv}} = \text{deg.} \times \text{cm}^2/\text{dmol} \times 10^{-3}$.

2.9. Phospholipase A₂ activity

The activity of PLA₂ was determined by indirect haemolytic activity in accordance with the methodology previously described by Gutiérrez et al. (1988) [23]. A 1% agarose gel supplemented with egg yolk and human erythrocytes and washed with PBS (pH 7.2) was used. Both BaltPLA₂ (10 µg) and the bioconjugate (BaltPLA₂ [10 µg] + CdSe/CdS MSQD [20 µg]) were diluted in 50 µL PBS and applied to uniformly sized holes made in the gel. The crude venom of *B. alternatus* (10 µg in 50 µL PBS) was used as a positive control and PBS (50 µL) as a negative control. After this process, the gel was incubated at room temperature

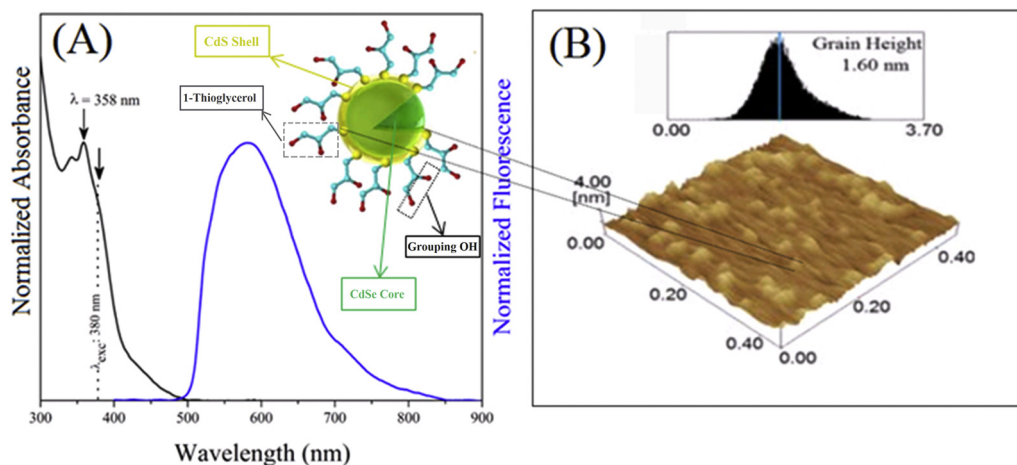


Fig. 1. Physical characterisation of CdSe/CdS MSQDs. (A) Fluorescence spectrum at a resolution of 1 nm. Arbitrary units are defined as relative to the most intense bands, which are taken as 1. (B) Atomic force microscopy image demonstrating the size of quantum dots. Black and blue lines represent the normalised absorbance and fluorescence, respectively.

for 24 h, and haemolytic activity identified by the formation of translucent halos. These halos indicate the ability of the sample to hydrolyse phospholipids. Results were expressed as the diameter of the halos (mm), and statistical analyses were performed by one-way ANOVA with Bonferroni's post-hoc test. All assays were performed in triplicate.

2.10. Myoblast cell culture

Myoblasts (C2C12 cells) were used to assess the bioconjugation of CdSe/CdS MSQD to BaltPLA₂ and study the entry and subsequent localisation of PLA₂ in cells. The cells were maintained in Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 medium (Gibco, Invitrogen, Carlsbad) supplemented with 10% foetal bovine serum (FBS), 25 mM HEPES, penicillin (100 U/mL), streptomycin (100 U/mL), 2 mM L-glutamine and 3 mM sodium bicarbonate and maintained at 37 °C in a humidified atmosphere of 5% CO₂.

2.11. Tracking of quantum dot-labelled BaltPLA₂

Cells (8×10^3 cells/well) were plated in a 96-well plate, incubated for 24 h at 37 °C in 5% CO₂ and treated with CdSe/CdS MSQDs (200 ng/μL) + CdSe/CdS MSQDs (200 ng/μL) + BaltPLA₂ (100 ng/μL) for 18 h or 32 h. Images were acquired at the specified time points using an inverted fluorescence microscope system (EVOS fl-AMG, Seattle, USA) with excitation at 470 nm, and emissions were captured using a 525 nm filter.

2.12. Indirect immunofluorescence assay for BaltPLA₂

The indirect immunofluorescence assay (IFA) was carried out as previously described by Davoli-Ferreira et al. (2016), with some modifications [24]. Briefly, 1.0×10^4 myoblast cells/well were added to a 96-well plate and incubated for 24 h in a 5% CO₂ atmosphere at 37 °C. Then, cells were treated with BaltPLA₂ at 12.5 μg/mL in three replicates, using RPMI medium as a negative control. After 24 h of incubation the supernatant was removed, and the cells washed with PBS and fixed with 4% formaldehyde solution for 20 min at room temperature. Wells were washed with PBS, and a solution containing 1% Triton™ X-100 and 2% bovine serum albumin (BSA) was added, followed by incubation for 1 h at room temperature. Cells were washed again with PBS and incubated for 1 h with mouse serum containing polyclonal anti-BaltPLA₂ antibodies diluted in Tween (0.05%) and 0.5% BSA. A final PBS wash was carried out and the antibody Alexa Fluor 488 anti-mouse IgG conjugated to fluorescein isothiocyanate (FITC) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) diluted 1:1000 in DAPI solution at 300 nM was added, followed by incubation for 1 h at room temperature. Finally, the wells were washed with PBS and the images were acquired as described in Section 2.11.

3. Results

3.1. Physical characterisation of CdSe/CdS MSQDs

Absorption and luminescence spectra of CdSe/CdS MSQDs (Fig. 1A) revealed narrow absorption bands and broad emission spectra, which are characteristic of CdSe/CdS MSQDs. The broad emission spectrum is interesting since it was possible to detect the luminescence of the CdSe/CdS MSQDs in fluorescence microscopy using two filters (green and red). The AFM images revealed that the size of the CdSe/CdS MSQDs was approximately 1.6 nm (Fig. 1B).

3.2. Bioconjugation of CdSe/CdS MSQDs with BaltPLA₂

Analysis of BaltPLA₂, CdSe/CdS MSQDs and CdSe/CdS MSQD-labelled BaltPLA₂ by FTIR revealed two regions; A (850–1500 cm⁻¹) and B (2630–2930 cm⁻¹) (Fig. 2A). In the A region, bands were observed in the range of 870–980 cm⁻¹, and at 1046, 1086 and 1421 cm⁻¹. The CdSe/CdS MSQD-labelled BaltPLA₂ spectrum shows bands at 877,

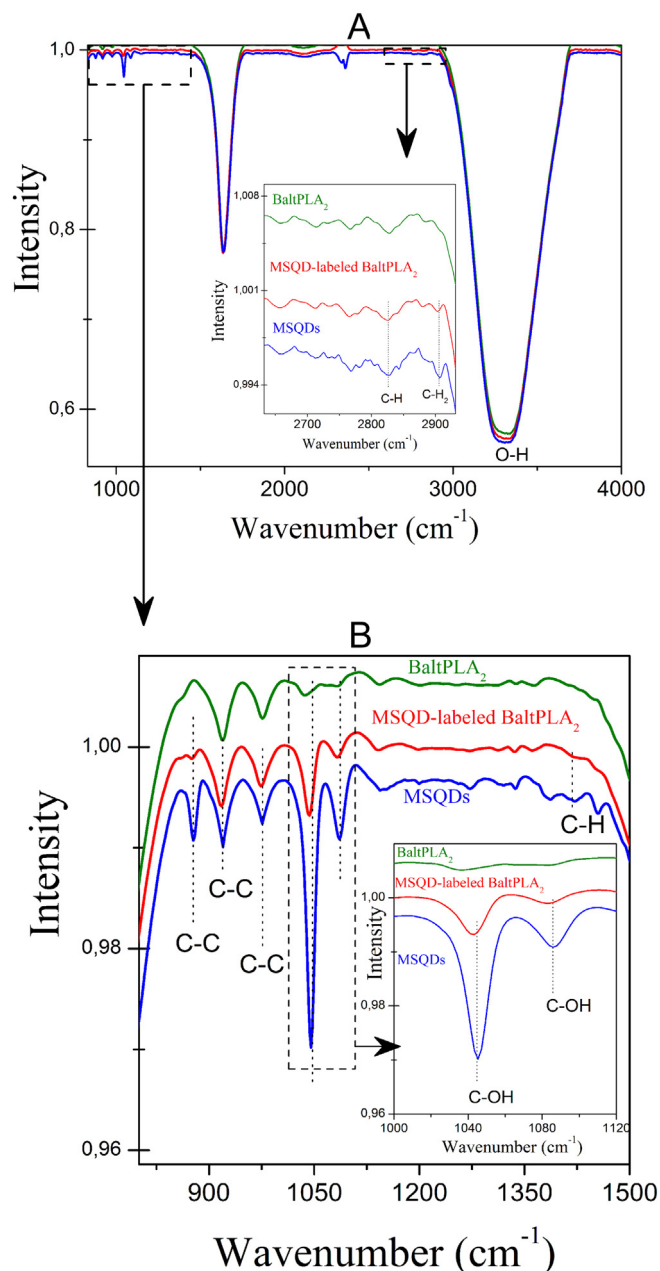


Fig. 2. Fourier transform infrared spectra of BaltPLA₂, CdSe/CdS MSQD-labelled BaltPLA₂ and CdSe/CdS MSQDs at room temperature.

1046, 1086 and 1421 cm⁻¹ with lower intensities than the same bands of the CdSe/CdS MSQD spectrum. In the B region, bands were observed at 2825 and 2910 cm⁻¹. The intensity of the latter band was decreased in the spectra of the bioconjugate.

3.3. Reversed-phase chromatography

Chromatography of CdSe/CdS MSQD-labelled BaltPLA₂ showed that as the proportion of CdSe/CdS MSQDs in the bioconjugate increased, the peak absorbance of pure BaltPLA₂ (Fig. 3A) decreased and was displaced to the left of the graph (Fig. 3B–D).

3.4. Circular dichroism spectroscopy

The CD spectra of BaltPLA₂ and CdSe/CdS MSQD-labelled BaltPLA₂ all showed characteristic curves for helical proteins, including well-defined

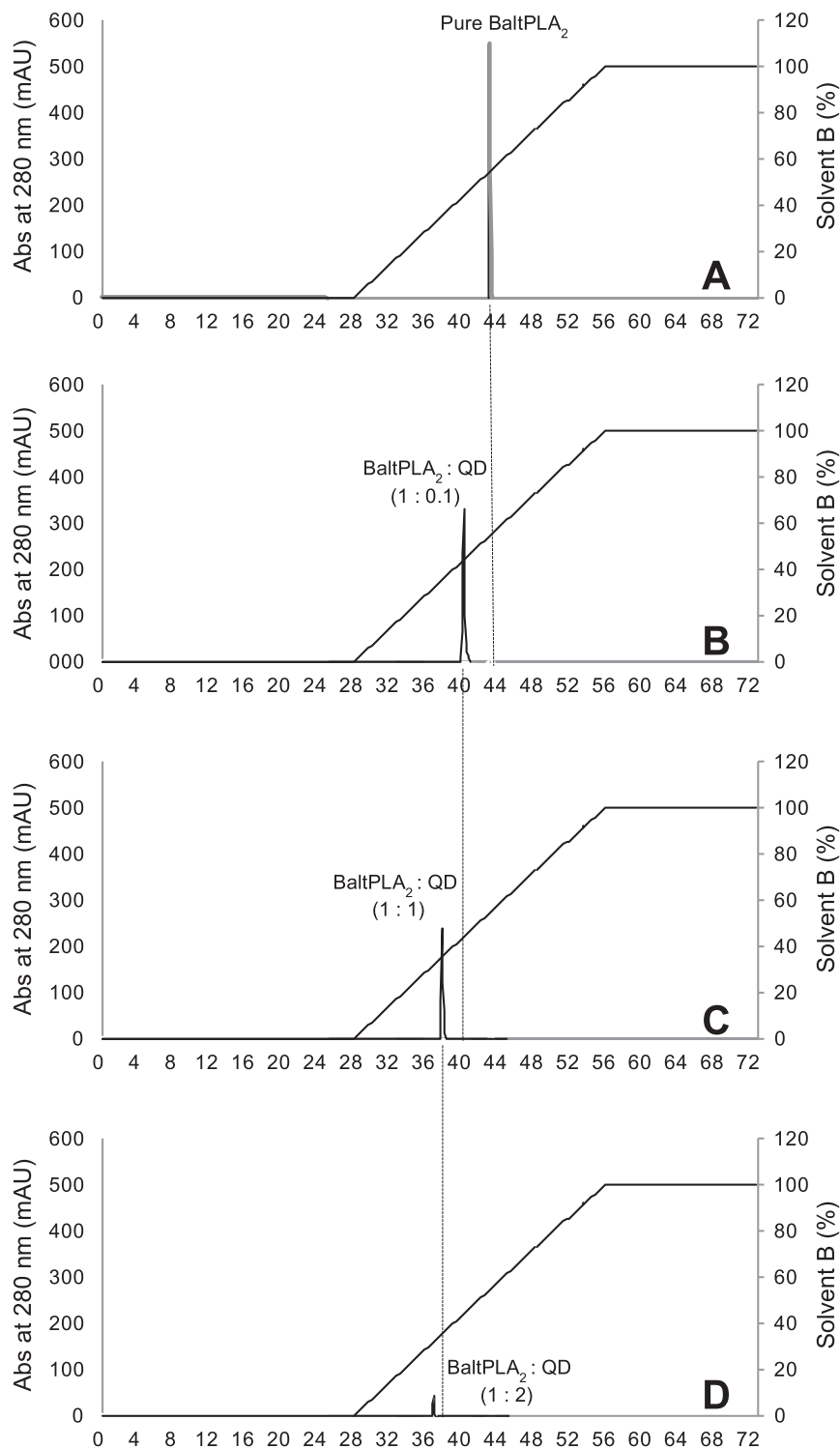


Fig. 3. Reverse-phase chromatography on a C2/C3 column. A) Pure BaltPLA₂ (non-conjugated). B) CdSe/CdS MSQD-labelled BaltPLA₂ at a ratio of 1:0.1 (BaltPLA₂:CdSe/CdS MSQD), C) 1:1 and D) 1:2 w/w.

peaks at 208 and 222 nm. This indicates that the interaction with CdSe/CdS MSQD did not change the three-dimensional conformation of BaltPLA₂ (Fig. 4).

3.5. Phospholipase A₂ activity

The interaction of CdSe/CdS MSQDs with BaltPLA₂ did not significantly alter the enzyme activity, as indicated by the formation of similarly sized halos ($p > 0.05$). Only a small reduction of PLA₂ activity was

observed in CdSe/CdS MSQD-labelled BaltPLA₂ (average halo size of 153.3 ± 5.8 mm) compared with BaltPLA₂ alone (163.3 ± 5.8 mm) (Fig. 5B).

3.6. Tracking of CdSe/CdS MSQD-labelled BaltPLA₂

Myoblasts (control cells) typically present elongated forms with clear cytoplasmic processes (Fig. 6A). Cells that were treated with CdSe/CdS MSQDs (200 ng/ μ L) for 18 h showed the presence of a small

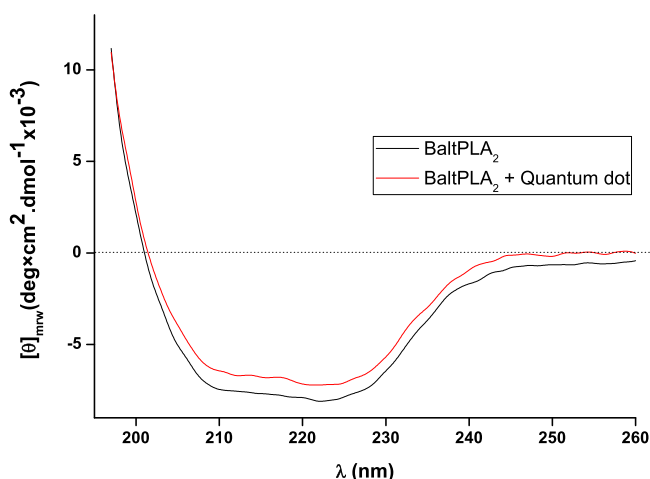


Fig. 4. Circular dichroism spectra of BaltPLA₂ (black line) and quantum dot-labelled BaltPLA₂ (red line).

amount of CdSe/CdS MSQDs, as evidenced by fluorescence spectroscopy (Fig. 6B). On the other hand, myoblasts treated with CdSe/CdS MSQD-labelled BaltPLA₂ exhibited significant green fluorescence at the surface of the plasma membrane (Fig. 6C). It was also observed that after 32 h, CdSe/CdS MSQD-labelled BaltPLA₂ was present in the cell nucleus (Fig. 6D).

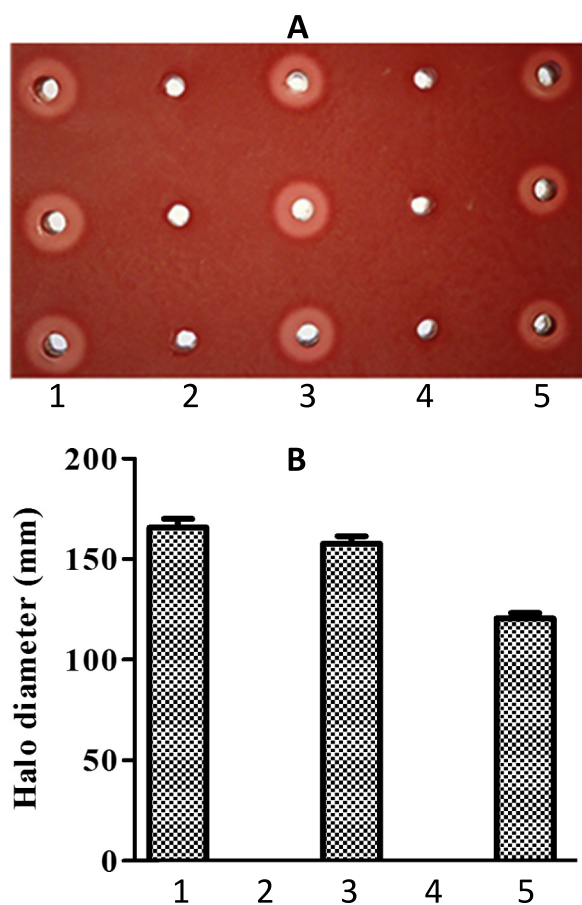


Fig. 5. Phospholipase A₂ activity of BaltPLA₂. (A) Agarose gel showing the formation of translucent halos. 1: BaltPLA₂; 2: CdSe/CdS MSQDs; 3: CdSe/CdS MSQD-labelled BaltPLA₂; 4: PBS; 5: snake venom. (B) Quantitative analysis. Statistical analyses were performed by one-way ANOVA with Bonferroni's post-test.

3.7. Indirect immunofluorescence assay

After 24 h of incubation, BaltPLA₂ was found scattered throughout the cell, in both the cytoplasm and nuclei of myoblasts.

4. Discussion

To our knowledge, this is the first study to present a rapid and sensitive CdSe/CdS MSQD probe for the direct tracking of PLA₂ from snake venom. Analysis of zoomed regions of the FTIR spectra enabled the elucidation of the specific interactions of the bioconjugate. Several bands were observed in the 850–1500 cm⁻¹ region (Fig. 2B). Bands in the range of 870–980 cm⁻¹ are characteristic of C—C vibrating modes; while those at 1046, 1086 and 1421 cm⁻¹ represent primary alcohol C—OH stretching, secondary alcohol C—OH stretching and C—H stretching vibrating modes, respectively [25]. These vibration modes can be attributed to the external hydroxyl groups of the stabiliser 1-thioglycerol, which was used for synthesis and coats the CdSe/CdS MSQDs. Interestingly, the CdSe/CdS MSQD-labelled BaltPLA₂ spectrum shows the bands at 877, 1046, 1086 and 1421 cm⁻¹ with lower intensities than the same bands in the CdSe/CdS MSQD spectrum. This suggests that the interaction between CdSe/CdS MSQDs and BaltPLA₂ occurs in the region of the hydroxyl groups of 1-thioglycerol (Fig. 1), and that the interaction is strong because it also alters the intensities of the C—C and C—H vibrating modes.

Bands were observed at 2825 cm⁻¹ of the B region, indicating C—H stretching vibrating modes; and at 2910 cm⁻¹, which can be attributed to C—H₂ symmetric stretching vibrating modes [17,26]. The intensity of the band at 2910 cm⁻¹ was reduced in the spectrum of the bioconjugate, indicating that the interaction between BaltPLA₂ and CdSe/CdS MSQDs is strong enough to distort the C—H₂ symmetric stretching vibrating modes of BaltPLA₂. In addition, changes in the 2910 cm⁻¹ vibrational mode probably relate to the aliphatic hydrocarbon groups of botropic phospholipases A₂ [32]. Based on these results, we propose that the formation of the bioconjugate occurs through dipole-dipole interactions between the hydroxyl groups of 1-thioglycerol of CdSe/CdS MSQDs and the aliphatic hydrocarbon groups of BaltPLA₂.

The binding between CdSe/CdS MSQD and BaltPLA₂ appeared to be a specific interaction, because it has been reported that CdSe/CdS MSQD does not interact with Bmoos [23], a serine protease purified from *B. moojeni* snake venom (data not shown). Our results show that BaltPLA₂ does not undergo conformational changes when bioconjugated with CdSe/CdS MSQDs, indicated by the unchanged enzyme vibrational modes of the bioconjugate. The high stability of these enzymes, due to the high disulphide bond contents, is likely to be responsible for this finding [26,27].

Reversed-phase chromatography revealed the composition of the bioconjugates, and also enabled the isolation of unreacted BaltPLA₂ or CdSe/CdS MSQDs, which could lead to inaccurate results of the tracking assays if not removed. The results (Fig. 3) suggest that BaltPLA₂ can bind to different amounts of CdSe/CdS MSQD. As the amount of bound CdSe/CdS MSQD increased, the peak intensity decreased and peaks were displaced to the left of the graph. This indicates that the binding of CdSe/CdS MSQD causes reduced UV absorption and alters the hydrophobic character of BaltPLA₂. Following these observations, the ratio of 1:2 (w/w) was chosen for the tracking assay, as this preparation leaves no free BaltPLA₂, which is confirmed by the lack of peak corresponding to pure (free) BaltPLA₂ in the chromatogram of the 1:2 solution (Fig. 3D). Further studies revealed that there was no absorbance peak corresponding to BaltPLA₂ in a solution with the ratio 1:4 (w/w) (data not shown), suggesting that in this case, the BaltPLA₂ was saturated and excess CdSe/CdS MSQD was present.

Bioconjugation processes usually utilise reagents that favour binding between nanocrystals and biomolecules [27] in complex processes involving several expensive steps and reagents. The bioconjugation presented in this work occurred spontaneously; and a simple, fast and

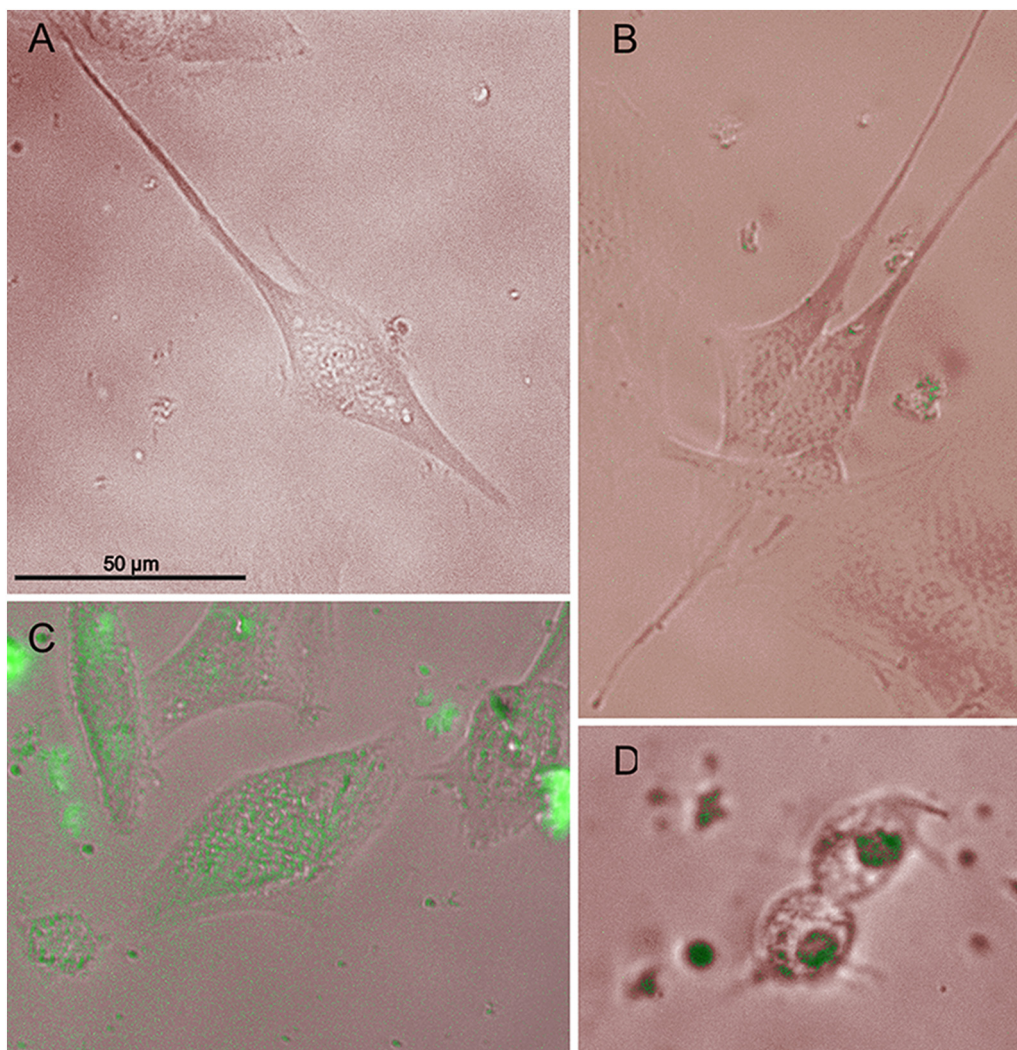


Fig. 6. Fluorescence microscopy images of (A) control myoblast cells, (B) cells treated with CdSe/CdS MSQDs (200 ng/µL) for 18 h, (C) cells treated with CdSe/CdS MSQDs (200 ng/µL) + BaltPLA₂ (100 ng/µL) for 18 h and (D) cells treated with CdSe/CdS MSQDs (200 ng/µL) + BaltPLA₂ (100 ng/µL) for 32 h. Scale bar = 50 µm.

inexpensive methodology is presented. This highlights the potential of CdSe/CdS MSQDs for diverse applications in the detection and tracking of biomolecules. The results of enzyme activity assays (Fig. 5) and CD spectroscopy (Fig. 4) revealed that bioconjugation did not change

native conformation of PLA₂, confirming the value of CdSe/CdS MSQDs bioconjugation for biological investigations.

In this work, we used myoblasts to detect and track BaltPLA₂ within cells. Our results showed no interaction between CdSe/CdS MSQDs and

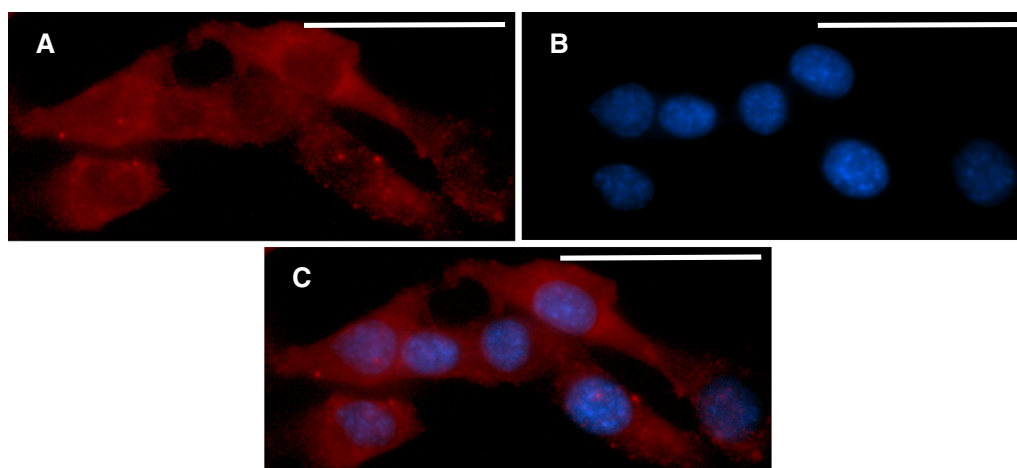


Fig. 7. Immunofluorescence microscopy of BaltPLA₂ in cultured myoblasts. Fluorescence images of (A) BaltPLA₂, (B) DAPI (nucleus stain) and (C) overlay. Scale bar = 50 µm.

the plasma membrane of the myoblasts, as no change in cell morphology was observed when they were incubated with only CdSe/CdS MSQDs for 18 h (Fig. 6B). In these conditions, a small amount of CdSe/CdS MSQD luminescence was observed. This small amount may be explained by the high diffusion of CdSe/CdS MSQDs in the medium surrounding the cells. On the other hand, when cells were incubated with CdSe/CdS MSQD-labelled BaltPLA₂, significant luminescence was detected at the surface of the plasma membrane. This can be attributed to the high affinity of the enzyme for phospholipids that constitute the plasma membrane [23]. These results corroborate the IR analysis (Fig. 2), which further confirms that CdSe/CdS MSQDs were successfully conjugated with BaltPLA₂. Our results also showed that after penetrating the membrane, CdSe/CdS MSQD-labelled BaltPLA₂ migrates to the nuclear region of the cell. After 32 h of incubation, CdSe/CdS MSQD-labelled BaltPLA₂ was found in the cell nucleus, at the time it was preparing to divide (Fig. 6D). This stage of cell division is telophase, the final stage of mitosis [28]. Our results of indirect immunofluorescence microscopy corroborate these findings. After 24 h of incubation, BaltPLA₂ was found in myoblast nuclei (Fig. 7), which is in line with the findings of Murakami et al. [29]. According to these authors, PLA₂ from snake venom can enter cells and reach intracellular targets including membrane receptors and the perinuclear area. Another study used laser scanning confocal microscopy to demonstrate that Alexa-labelled PLA₂ enters the cytoplasm of rat hippocampal neurons and, subsequently, the nuclei [30]. In addition, Rigoni et al. [31] used similar methodology to show that snake PLA₂ is able to penetrate spinal cord motor neurons and cerebellar granule neurons, and selectively bind to mitochondria.

In summary, this work describes the spontaneous bioconjugation between CdSe/CdS MSQDs and a PLA₂ enzyme isolated from the venom of *B. alternatus*. We have produced a stable and efficient luminescent probe to detect and track this enzyme following cell entry. This probe may provide a useful tool for the elucidation of biological mechanisms that involve PLA₂s, many of which are still unknown.

Conflict of interest

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge the financial support of Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES) and the Ministério de Ciências e Tecnologia (MCT) of Brazil.

The acquisition of FT-IR spectra using a multipurpose Shimadzu Fourier Transform IR spectrophotometer (Vertex 70, Bruker Optik) was performed at the CPBIO Laboratory, School of Dentistry, Federal University of Uberlândia (UFU), under the coordination of Prof. Dr. Carlos José Soares. The Shimadzu AFM at the Institute of Physics (INFIS), UFU, is supported by a 'Pró-Equipamentos' grant from the Brazilian Agency CAPES, under coordination of Prof. Dr. Noelio Oliveira Dantas.

The acquisition of fluorescence microscopy images using a fluorescence microscope system (EVOS fl-AMG, Seattle, USA) was performed at the immunology laboratory, UFU, under coordination of Prof. Dr. Tiago Wilson Patriarca Mineo.

The Circular dichroism spectroscopy using a JASCO J-815 spectrophotometer was performed at the Department of Biochemistry and Chemical Technology, São Paulo State University (UNESP), Araraquara-SP, under coordination of Prof. Dr. Eduardo Maffud Cilli.

References

- [1] M. Murakami, Y. Taketomi, H. Sato, K. Yamamoto, Secreted phospholipase A₂ revisited, *J. Biochem.* 150 (2011) 233–255.
- [2] R.M. Botting, Cyclooxygenase: past, present and future. A tribute to John R. Vane (1927–2004), *J. Therm. Biol.* 31 (2006) 208–219.
- [3] S.M.T. Serrano, A.P. Reichl, R. Mentete, E.A. Auerswald, M.L. Santoro, C.A.M. Sampaio, A.C.M. Camargo, M.T. Assakura, A novel phospholipase A₂, BJ-PLA₂, from the venom of the snake *Bothrops jararaca*: purification, primary structure analysis, and its characterization as a platelet-aggregation-inhibiting factor, *Arch. Biochem. Biophys.* 367 (1999) 26–32.
- [4] C.P. Bernardes, D.L. Menaldo, C.C. Mamede, K.F. Zoccal, A.C. Cintra, L.H. Faccioli, L. Stanzola, F. de Oliveira, S.V. Sampaio, Evaluation of the local inflammatory events induced by BpirMP, a metalloproteinase from *Bothrops pirajai* venom, *Mol. Immunol.* 68 (2015) 456–464.
- [5] C.C.N. Mamede, B.B. de Sousa, D.F.da C. Pereira, M.S. Matias, M.R. de Queiroz, N.C.G. de Moraes, S.A.P.B. Vieira, L. Stanzola, F. de Oliveira, Comparative analysis of local effects caused by *Bothrops alternatus* and *Bothrops moojeni* snake venoms: enzymatic contributions and inflammatory modulations, *Toxicol.* 117 (2016) 37–45.
- [6] N.A. Santos-Filho, L.B. Silveira, C.Z. Oliveira, C.P. Bernardes, D.L. Menaldo, A.L. Fuly, E.C. Arantes, S.V. Sampaio, C.C.N. Mamede, M.E. Beletti, F. de Oliveira, A.M. Soares, A new acidic myotoxic, anti-platelet and prostaglandin I₂ inducer phospholipase A₂ isolated from *Bothrops moojeni* snake venom, *Toxicol.* 52 (2008) 908–917.
- [7] L.A. Ponce-Soto, J.C. Barros, S. Marangoni, S. Hernandez, C.A.D. Belo, A.P. Corrado, S. Hyslop, L. Rodrigues-Simioni, Neuromuscular activity of BaTX, a presynaptic basic PLA₂ isolated from *Bothrops alternatus* snake venom, *Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol.* 150 (2009) 291–297.
- [8] M.A.P. Rodrigues, L. Dias, A.L. Rennó, N.C. Sousa, A. Smaal, D.A. da Silva, S. Hyslop, Rat arial responses to *Bothrops jararacussu* (jararacuca) snake venom, *Toxicology* 323 (2014) 109–124.
- [9] J.R. Almeida, M. Lancellotti, A.M. Soares, L.A. Calderon, D. Ramirez, W. González, S. Marangoni, S.L. da Silva, CoaTx-II, a new dimeric Lys49 phospholipase A₂ from *Crotalus oreganus abyssus* snake venom with bactericidal potential: insights into its structure and biological roles, *Toxicol.* 120 (2016) 147–158.
- [10] I.P. Borges, L.E. Castanheira, B.F. Barbosa, D.L.N. de Souza, R.J. da Silva, J.R. Mineo, K.A.Y. Tadini, R.S. Rodrigues, E.A.V. Ferro, V.de M. Rodrigues, Anti-parasitic effect on *Toxoplasma gondii* induced by BnSP-7, a Lys49-phospholipase A₂ homologue from *Bothrops pauloensis* venom, *Toxicol.* 119 (2016) 84–91.
- [11] I. Jridi, I. Catacchio, H. Majdoub, D. Shahbazzadeh, M.E. Ayeb, M.A. Frassanito, A. Solimando, D. Ribatti, A. Vacca, L. Borchani, Hemilipin, a novel *Hemiscorpius lepturus* venom heterodimeric phospholipase A₂, which inhibits angiogenesis in vitro and in vivo, *Toxicol.* 105 (2015) 34–44.
- [12] L.B. Silveira, D.P. Marchi-Salvador, N.A. Santos-Filho, F.P. Silva Jr., S. Marcussi, A.L. Fuly, A. Nomizo, S.L. da Silva, R.G. Stábeli, E.C. Arantes, A.M. Soares, Isolation and expression of a hypotensive and anti-platelet acidic phospholipase A₂ from *Bothrops moojeni* snake venom, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 73 (2013) 35–43.
- [13] A.C.A. Silva, S.L.V. de Deus, M.J.B. Silva, N.O. Dantas, Highly stable luminescence of CdSe magic-sized quantum dots in HeLa cells, *Sensors Actuators B Chem.* 191 (2014) 108–114.
- [14] E. Abbasi, T. Kafshdooz, M. Bakhtiari, N. Nikzamir, N. Nikzamir, M. Nikzamir, M. Mohammadian, A. Akbarzadeh, Biomedical and biological applications of quantum dots, *Artif. Cells Nanomed. Biotechnol.* 44 (2016) 885–891.
- [15] R. Jose, N.U. Zhanpeisov, H. Fukumura, Y. Baba, M. Ishikawa, Structure–property correlation of CdSe clusters using experimental results and first-principles DFT calculations, *J. Am. Chem. Soc.* 128 (2006) 629–636.
- [16] V. Pilla, S.R. de Lima, A.A. Andrade, A.C.A. Silva, N.O. Dantas, Fluorescence quantum efficiency of CdSe/CdS magic-sized quantum dots functionalized with carboxyl or hydroxyl groups, *Chem. Phys. Lett.* 580 (2013) 130–134.
- [17] A.C.A. Silva, S.W. da Silva, P.C. Morais, N.O. Dantas, Shell thickness modulation in ultrasmall CdSe/CdS x Se $1-x$ /CdS Core/Shell quantum dots via 1-Thioglycerol, *ACS Nano* 8 (2014) 1913–1922.
- [18] A.C.A. Silva, A.P. Freschi, C.M. Rodrigues, B.F. Matias, L.P. Maia, L.R. Goulart, N.O. Dantas, Biological analysis and imaging applications of CdSe/CdS x Se $1-x$ /CdS core-shell magic-sized quantum dot, *Nanomedicine* 12 (2016) 1421–1430.
- [19] V.R. Kethinedi, G. Crivat, M.A. Tar, Z. Rosenzweig, Quantum dot-NBD-liposome luminescent probes for monitoring phospholipase A₂ activity, *Anal. Bioanal. Chem.* 405 (2013) 9729–9737.
- [20] J. Li, W.Y. Lee, T. Wu, J. Xu, K. Zhang, G. Li, J. Xia, L. Bian, Multifunctional quantum dot nanoparticles for effective differentiation and long-term tracking of human mesenchymal stem cells in vitro and in vivo, *Adv. Healthc. Mater.* 5 (2016) 1049–1057.
- [21] M.M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.* 72 (1976) 248–254.
- [22] A.C.A. Silva, E.S.F. Neto, S.W. da Silva, P.C. Morais, N.O. Dantas, Modified phonon confinement model and its application to CdSe/CdS core-shell magic-sized quantum dots synthesized in aqueous solution by a new route, *J. Phys. Chem. C* 117 (2013) 1904–1914.
- [23] J. Gutiérrez, C. Avila, E. Rojas, L. Cerdas, An alternative in vitro method for testing the potency of the polyvalent antivenom produced in Costa Rica, *Toxicol.* 26 (1988) 411–413.
- [24] M. Davoli-Ferreira, D.M. Fonseca, C.M. Mota, M.S. Dias, D.S. Lima-Junior, M.V. da Silva, G.F.S. Quirino, D.S. Zamboni, J.S. Silva, T.W.P. Mineo, Nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 2 prompts potent inflammatory stimuli during *Neospora caninum* infection, *Sci. Rep.* 6 (2016), 29289.
- [25] U.C. Agarwala, H.L. Nigam, S. Agrawal, *Infrared Spectroscopy of Molecules*, first ed. World Scientific Publishing Company, Singapore, 2014.
- [26] R. Arni, R. Ward, Phospholipase A₂—a structural review, *Toxicol.* 34 (1996) 827–841.
- [27] C.C. Leslie, M.H. Gelb, Assaying phospholipase A₂ activity, *Methods Mol. Biol.* 284 (2004) 229–242.

- [28] C.E. Walczak, S. Cai, A. Khodjakov, Mechanisms of chromosome behaviour during mitosis, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 11 (2004) 91.
- [29] M. Murakami, T. Kambe, S. Shimbara, S. Yamamoto, H. Kuwata, I. Kudo, Functional association of type IIA secretory phospholipase A₂ with the glycosylphosphatidylinositol-anchored Heparan sulfate proteoglycan in the Cyclooxygenase-2-mediated delayed Prostanoid-biosynthetic pathway, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 29927–29936.
- [30] U. Petrovic, J. Šribar, A. Paris, M. Rupnik, M. Kržan, N. Vardjan, F. Gubenšek, R. Zorec, I. Križaj, Ammodytotoxin, a neurotoxic secreted phospholipase A₂, can act in the cytosol of the nerve cell, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 324 (2004) 981–985.
- [31] M.R. Rigoni, M. Paoli, E. Milanese, P. Caccin, A. Rasola, P. Bernardi, C. Montecucco, Snake phospholipase A₂ neurotoxins enter neurons, bind specifically to mitochondria, and open their transition pores, *J. Biol. Chem.* 283 (2008) 34013–34020.
- [32] A.L. Cecchini, A.M. Soares, R. Cecchini, A.H.C. de Oliveira, R.J. Ward, J.R. Giglio, E.C. Arantes, Effect of crotopotin on the biological activity of Asp49 and Lys49 phospholipases A₂ from Bothrops snake venoms, *Comp. Biochem. Physiol. C* 138 (2004) 429–436.