



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

**ANTICORPOS IGY POLICLONAIS ANTI-FOSFOLIPASE A₂:
FERRAMENTA AUXILIAR PARA O ESTUDO DA AÇÃO ANTI-
PARASITÁRIA**

Aluna: Isabela Pacheco Borges

Orientadora: Veridiana de Melo Rodrigues Ávila

**UBERLÂNDIA - MG
2019**



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

**ANTICORPOS IGY POLICLONAIS ANTI-FOSFOLIPASE A₂:
FERRAMENTA AUXILIAR PARA O ESTUDO DA AÇÃO ANTI-
PARASITÁRIA**

Aluna: Isabela Pacheco Borges

Orientadora: Veridiana de Melo Rodrigues Ávila

**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

Ficha Catalográfica Online do Sistema de Bibliotecas da UFU
com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

B732 2019	<p>Borges, Isabela Pacheco, 1990- ANTICORPOS IGY POLICLONAIIS ANTI-FOSFOLIPASE A2: FERRAMENTA AUXILIAR PARA O ESTUDO DA AÇÃO ANTI- PARASITÁRIA [recurso eletrônico] / Isabela Pacheco Borges. - 2019.</p> <p>Orientadora: Veridiana de Melo Rodrigues `vila. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Pós-graduação em Genética e Bioquímica. Modo de acesso: Internet. Disponível em: http://dx.doi.org/10.14393/ufu.te. 2019.2148 Inclui bibliografia.</p> <p>1. Genética. I. `vila, Veridiana de Melo Rodrigues, 1971-, (Orient.). II. Universidade Federal de Uberlândia. Pós- graduação em Genética e Bioquímica. III. Título. CDU: 575</p>
--------------	--

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:
Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091
Nelson Marcos Ferreira - CRB6/3074



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

ATA DE DEFESA

Programa de Pós-Graduação em:	Genética e Bioquímica				
Defesa de:	Tese de Doutorado Acadêmico - nº 05/2019 - PPGGB				
Data:	Vinte e quatro de julho de 2019	Hora de início:	14:00h	Hora de encerramento:	19:50h
Matrícula do Discente:	11523GBI010				
Nome do Discente:	Isabela Pacheco Borges				
Título do Trabalho:	Anticorpos IgY policlonais anti-fosfolipase A ₂ : Ferramenta para o estudo da ação antiparasitária.				
Área de concentração:	Bioquímica				
Linha de pesquisa:	Estrutura e Função de Proteínas.				
Projeto de Pesquisa de vinculação:	Estudo das atividades biológicas e moleculares de toxinas isoladas de peçonha Botrópicas em Leishmania: Efeito na interação parasita-hospedeiro.				

Aos vinte e quatro dias do mês de julho de dois mil e dezenove, às 14:00 horas no Bloco 2E, sala 211, 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^ª. Dr^ª. Angélica de Oliveira Gomes, Prof^ª. Dr^ª. Daiana Silva Lopes, Dr^ª. Tássia Rafaella Costa, Prof^ª. Dr^ª. Bruna Barbosa de Sousa Simamoto e Prof^ª. Dr^ª. Veridiana de Melo Rodrigues Ávila, 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. Veridiana de Melo Rodrigues Ávila, 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): APROVADA. 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. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pela Banca Examinadora.



Documento assinado eletronicamente por **Veridiana de Melo Rodrigues Avila, Professor(a) do Magistério Superior**, em 24/07/2019, às 19:52, 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 **Bruna Barbosa de Sousa Simamoto, Professor(a) Substituto(a) do Magistério Superior**, em 24/07/2019, às 19:53, 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 **Tássia Rafaella Costa, Usuário Externo**, em 24/07/2019, às 19:55, 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 **Angelica de Oliveira Gomes, Usuário Externo**, em 24/07/2019, às 19:56, 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 **Daiana Silva Lopes, Usuário Externo**, em 24/07/2019, às 19:57, 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 **1367953** e o código CRC **2BEC0985**.

Dedicatória

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

A minha mãe Maria Inês, pelo amor incondicional e principalmente por sempre me apoiar em qualquer momento e qualquer circunstância. O seu amor me dá força para sempre seguir em frente e me tornar uma profissional melhor.

A minha avó Cleide (*In memoriam*) por tudo que você representou e ainda representa na minha vida. Em todos os momentos mais difíceis você estava lá me apoiando, incentivando e acreditando que eu era capaz. O amor que você dedicou a mim e a nossa família durante os 83 anos de vida é o que eu carrego de mais valioso e enche meu coração de conforto por não te ter fisicamente nessa última etapa na minha carreira acadêmica.

Tenho certeza que aonde quer que você esteja, está comigo e torcendo pelo meu sucesso. E eu estou aqui sempre mandando todas orações para que Deus cuide de você.

Madrinha, eu te amo muito!

Agradecimentos

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

Ao meu namorado Luiz, por estar ao meu lado durante os 3 anos do meu doutorado me apoiando, acreditando no meu potencial. Amorzinho seu companheirismo me dá forças para que eu possa seguir em frente na busca do meu sonho! Obrigada por escolher trilhar o seu caminho ao lado do meu. Te amo!

Ao meu irmão Rafael, por escutar meus desafabos há 28 anos! Essa vida que escolhemos não é fácil, mas com um irmão/amigo como você torna tudo mais leve.

À prof.^a Dr^a Veridiana de Melo Rodrigues Ávila pela orientação desde a iniciação científica, por sempre ter acreditado que eu era capaz! Veri, muito obrigada por toda a sua dedicação, não só a mim, mas a todos os colegas de laboratório! Obrigada por ser presente, pelo apoio, incentivo, pela paciência com minhas dúvidas e erros e por ser esse grande exemplo de pessoa e profissional. Meu eterno carinho e gratidão por toda trajetória que trilhamos durante esses 10 anos de convivência! Eu espero que nossa parceria seja eterna!

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

À Prof.^a Dr^a Bellisa por ser tão disposta a ajudar nos experimentos, desde o desenho experimental até a execução deles. Obrigada pelas considerações preciosas em praticamente toda a minha carreira acadêmica. Te admiro muito como pessoa e profissional e espero que possamos trabalhar juntas ainda!

Á Prof.^a Dr^a Fernanda e a Mariana por terem me recebido tão bem em seu grupo de pesquisa e pela ajuda na execução nos experimentos.

Ao Prof. Dr Jair pelo apoio e disponibilidade ao sanar minhas dúvidas. O senhor é um grande exemplo de profissional que vou me espelhar para ser um dia.

Á Prof.^a Dr^a Cássia pelos grandes ensinamentos, apoio durante a minha preparação profissional. Receber suas críticas e elogios foi de grande importância para que cada vez mais eu pudesse me aperfeiçoar e me tornar uma grande profissional. Muito obrigada!

Ao prof. Dr. Álvaro e sua equipe pela inestimável colaboração para a produção dos anticorpos em galinhas.

Á minhas tias/irmãs Vera e Amélia que além de me apoiarem incondicionalmente estão sempre me alegrando com reuniões de famílias animadas com direito a muitas margaritas!

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

Aos demais amigos de laboratório: Mônica, Luana, Marinex, Tássia, Joice, José neto, Thiago, Priscila, Ana Cecília, Jean, Marina, Fernanda, Lorena, Lucas, Ana Claudia por fazerem do laboratório um ambiente descontraído e mais prazeroso, por todas as conversas, desabafos.

As minhas amigas de faculdade e companheiras de laboratório Rafaela e Deborah. Foi muito prazeroso trabalhar com vocês e fortalecer ainda mais a nossa amizade!

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

Ao apoio financeiro do CAPES, CNPq, FAPEMIG e UFU.

Lista de figuras

Figura 1: Representação esquemática do ciclo de infectividade do parasita <i>Toxoplasma gondii</i> .	6
Figura 2: Status de endemicidade da leishmaniose cutânea	8
Figura 3: Distribuição geográfica da leishmaniose cutânea.	10
Figura 4: Ciclo de vida de <i>Leishmania</i> spp.	11
Figura 5: Hidrólise de fosfolipídios por fosfolipases.	15
Figura 6: Apresentação esquemática de PLA ₂ s secretadas.	21
Figura 7: Representação estrutural tridimensional das fosfolipases.	24
Figura 8: Representação dos dois tipos de dímeros de PLA ₂ .	25
Figura 9: Diagrama de fita demonstrando a estrutura de BnSP-7.	27
Figura 10: Estrutura das imunoglobulinas.	33
Figura 11: Representação esquemática de um biossensor.	35
Figura 12: Purificação dos anticorpos IgY anti-BNSP-7.	52
Figura 13: ELISA indireto para monitoramento da cinética de produção de anticorpos IgY específicos de gemas de ovos e soro de galinhas imunizadas.	55
Figura 14: ELISA indireto conformacional para análise de reconhecimentos de epítomos contínuos e descontínuos utilizando a proteína alvo (BnSP-7) nativa e desnaturada.	58
Figura 15: Reatividade cruzada de anticorpos policlonais IgY anti-BnSP-7 pelo ensaio ELISA contra diferentes fosfolipases A ₂ de <i>B. pauloensis</i> , <i>B. jararacussu</i> e BpMP-I (metaloprotease) da peçonha de <i>B. pauloensis</i> .	60
Figura 16: Determinação da atividade neutralizante de anticorpos IgY anti-BnSP-7 sobre o efeito citotóxico da BnSP-7 em células musculares C2C12 pelo ensaio MTT.	63
Figura 17: Reconhecimento do alvo por anticorpos IgY policlonais anti-BnSP-7 em extratos bruto e solúvel de <i>T. gondii</i> e <i>L. (L.) amazonensis</i> por ELISA indireto.	66
Figura 18: Ensaio de anticorpos imunofluorescentes utilizando anticorpos anti-BnSP-7 IgY em <i>L. (L.) amazonensis</i> e <i>T. gondii</i> .	69
Figura 19: Efeito dos anticorpos IgY anti-BnSP-7 na citotoxicidade para <i>L. (L.) amazonensis</i> e <i>T. gondii</i> .	73

Figura 20: Efeitos do IgY anti-BnSP-7 no ensaio de proliferação de <i>L. (L.) amazonensis</i> e <i>T. gondii</i> . Parasitos tratados apenas com meio foram utilizados como controle.....	75
Figura 21: Efeitos do anti-BnSP-7 IgY na viabilidade em macrófagos MEMO.	77
Figura 22: Efeitos dos anticorpos IgY anti-BnSP-7 na invasão de <i>L. (L.) amazonensis</i> após o tratamento de promastigotas com IgY anti-BnSP-7 por 2 horas antes da infecção do parasita.....	77
Figura 23: Voltamogramas da superfície do eletrodo modificado na presença e na ausência das biomoléculas sondas (anticorpos), na presença da sonda redox ferro/ferricianeto de potássio ($K_4[Fe(CN)_6]/K_3[Fe(CN)_6].3H_2O$).....	82
Figura 24: Voltamogramas da superfície do eletrodo modificado na presença e na ausência das biomoléculas sondas (anticorpos anti-BnSP-7 e PBS), na presença da sonda redox ferro/ferricianeto de potássio ($K_4[Fe(CN)_6]/K_3[Fe(CN)_6].3H_2O$).....	86
Figura 25: Voltamogramas da superfície do eletrodo modificado na presença e na ausência das biomoléculas sondas (anticorpos anti-BnSP-7 e PBS), na presença da sonda redox ferro/ferricianeto de potássio ($K_4[Fe(CN)_6]/K_3[Fe(CN)_6].3H_2O$).....	87

Lista de tabelas

Tabela 1: Super famílias das fosfolipases A ₂	18
Tabela 2: Família de PLA ₂ secretadas.....	20

Sumário

Dedicatória	iv
Agradecimentos	v
Lista de figuras	viii
Lista de tabelas	x
Resumo	1
Abstract	2
1.0 - Introdução	3
1.1 - Toxoplasmose.....	3
1.2 – Leishmaniose	7
1.3 – Leishmaniose e Toxoplasmose: Um problema de saúde pública	12
1.4 - Classificação e características estruturais e funcionais das fosfolipases	14
1.5 - Fosfolipase A ₂ : Tipos, estrutura e mecanismos de ação	16
1.6 – Ação de Fosfolipases associadas à patogênese:	28
1.7 - Imunoglobulina Y:	30
2.0 – Objetivos gerais.....	36
2.1 – Objetivos específicos	36
3.0 – Materiais e métodos	38
3.1. Toxinas de peçonha de serpentes	38
3.2. Produção dos anticorpos policlonais.....	38
3.2.1. Imunização de galinhas	38
3.2.2. Preparação de extrato de proteína de gema e isolamento de IgYs.	39
3.3. Resposta específica ao antígeno durante o curso da imunização	40
3.4. Teste de avidéz.....	41
3.5 – Análise de reconhecimento conformacional por ELISA	41
3.6. Reatividade cruzada pelo ensaio de ELISA	41
3.7. Neutralização da atividade da PLA ₂ por citotoxicidade em células C2C12	42
3.8. Cultura de parasitos	43

3.9. Preparação de extratos de <i>T. gondii</i> e <i>L. (L.) amazonensis</i>	43
3.10. Reconhecimento de alvos no extrato de <i>T. gondii</i> e <i>L. (L.) amazonensis</i> por anti-BnSP-7 IgY	43
3.11. Ensaio de imunofluorescência	44
3.12. Ensaio de Citotoxicidade.....	45
3.12.1. Citotoxicidade em <i>L.(L.) amazonensis</i>	45
3.12.2. Citotoxicidade em taquizoítos de <i>T. gondii</i>	45
3.13. Ensaio anti-proliferativo.....	46
3.13.1. Ensaio anti-proliferativo em promastigostas de <i>L. (L.) amazonensis</i>	46
3.13.2. Ensaio anti-proliferativo em taquizoítos de <i>T. gondii</i>	46
3.14 – Cultura de células	47
3.14.1 - Extração de células mononucleares de sangue periférico humano (PBMC).....	47
3.14.2 – Extração de macrófagos	47
3.15 – Ensaio de Invasão.....	48
3.16 - Construção do bioeletrodo	48
3.17 - Detecção da BnSP-7 pelo bioeletrodo	49
3.18 - Detecção de alvo em extrato de <i>L. (L.) amazonensis</i> pelo bioeletrodo	50
3.19 - Análise Estatística.....	50
4.0 – Resultados e Discussão	51
4.1 – Imunização e Purificação de anticorpos IgY policlonais anti-BnSP-7 ..	51
4.2 – Produção de anticorpos IgY policlonais anti-BnSP-7 com alta avidéz .	54
4.3 – Os anticorpos IgY anti-BnSP-7 reconhecem epítomos descontínuos na sequência da BnSP-7	57
4.4 – Os anticorpos IgY anti-BnSP-7 são capazes de reconhecer diferentes fosfolipases A ₂	59
4.5 – Anticorpos IgY anti-BnSP-7 neutralizam a atividade citotóxica da BnSP-7 em células C2C12.....	62
4.6 – Anticorpos IgY anti-BnSP-7 detectam alvos nos extratos bruto e solúvel de <i>L. (L.) amazonensis</i> e <i>T. gondii</i>	65
4.7 – Anticorpos IgY anti-BnSP-7 detectam alvos na membrana de <i>L. (L.) amazonensis</i> e <i>T. gondii</i>	68
4.8 – Anticorpos IgY anti-BnSP-7 possuem efeito citotoxico em <i>L. (L.) amazonensis</i> e <i>T. gondii</i>	71

4.9 – Anticorpos IgY anti-BnSP-7 inibem a proliferação de formas promastigotas e taquizoitos de <i>L. (L.) amazonensis</i> e <i>T. gondii</i> , respectivamente.....	74
4.10 – <i>L. (L.) amazonensis</i> previamente tratada com IgY anti-BnSP-7 reduz sua invasão em macrófagos da medula óssea.	76
4.10 – Construção do Bioeletrodo e imobilização dos anticorpos IgY.....	81
4.11 – O imunossensor é capaz de reconhecer a proteína alvo BnSP-7.....	85
4.12 – Imunossensor imobilizado com anticorpos anti-BnSP-7 detectam alvos em extratos de <i>L. (L.) amazonensis</i>	86
5.0 - Conclusão	90
6.0 – Referências	90

Resumo

As fosfolipases (PLAs) têm sido associadas à patogênese em vários microorganismos. Estas estão envolvidas em processos de invasão celular, virulência, sobrevivência e remodelamento/modificação da composição de fosfolipídios de células hospedeiras e, portanto, cresce o interesse nessas enzimas como potenciais alvos para o controle do parasitismo. Nesse cenário, ovos de galinha imunizados com BnSP-7, uma fosfolipase A₂ Lys49 (PLA₂) homóloga isolada da peçonha de *Bothrops pauloensis*, representam uma excelente fonte de anticorpos policlonais com potencial atividade inibitória sobre PLAs parasitárias. Neste trabalho, relatamos a produção, caracterização e efeito antiparasitário de anticorpos IgY a partir de gemas de ovos imunizados com BnSP-7. Os anticorpos produzidos apresentaram avidéz e afinidade crescentes para epítomos de PLA₂s antigênicas durante a imunização. Os anticorpos anti-BnSP-7 IgY purificados em gemas de ovos foram capazes de reconhecer especificamente diferentes PLA₂s das peçonhas de *Bothrops pauloensis* e *Bothrops jararacussu* e inibir atividade citotóxica da BnSP-7 em células C2C12. Além disso, os anticorpos reconheceram alvos em extratos de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e *Toxoplasma gondii* por meio de ensaios de ELISA e imunofluorescência. Anticorpos anti-BnSP-7 IgY foram citotóxicos para taquizoitos de *T. gondii* e promastigotas de *L. (L.) amazonensis*, foram capazes de diminuir a proliferação de ambos os parasitas tratados antes da infecção e inibiram a invasão de formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis*. Por fim os anticorpos anti-BnSP-7 foram utilizados para construção de um imunossensor, o qual foi capaz de detectar a BnSP-7 e alvos no extrato de *L. (L.) amazonensis* com alta afinidade e seletividade. Analisados em conjunto, os resultados deste estudo sugerem que os anticorpos anti-BnSP-7 IgY representam uma ferramenta importante para descobrir novos alvos parasitas, bloquear os efeitos parasitários e servir como uma ferramenta de diagnóstico.

Palavras-chave: *Bothrops pauloensis*; fosfolipase A₂, peçonha de serpente, *Toxoplasma gondii*, *Leishmania (Leishmania) amazonensis*

Abstract

Activities of phospholipases (PLAs) have been linked to pathogenesis in various microorganisms. These are involved in processes of cell invasion, virulence, survival and remodeling / modification of the host cell phospholipid composition so the interest in these enzymes as potential targets that could contribute to the control of parasite survival and proliferation. Chicken eggs immunized with BnSP-7, a Lys49 phospholipase A₂ (PLA₂) homologue from *Bothrops pauloensis* snake venom, represent an excellent source of polyclonal antibodies with potential inhibitory activity on parasite PLAs. Herein, we report the production, characterization and anti-parasitic effect of IgY antibodies from egg yolks of hens immunized with BnSP-7. Produced antibodies presented increasing avidity and affinity for antigenic toxin epitopes throughout immunization, attaining a plateau after 4 weeks. Pooled egg yolks-purified anti-BnSP-7 IgY antibodies were able to specifically recognize different PLA₂s from *Bothrops pauloensis* and *Bothrops jararacussu* venom. Antibodies also neutralized BnSP-7 cytotoxic activity in C2C12 cells. In addition, the antibodies recognized targets in *Leishmania (Leishmania) amazonensis* and *Toxoplasma gondii* extracts by ELISA and immunofluorescence assays. Anti-BnSP-7 IgY antibodies were cytotoxic to *T. gondii* tachyzoites and *L. (L.) amazonensis* promastigotes were able to decrease the proliferation of both parasites treated prior to infection and inhibit the invasion of promastigotes forms of *L. (L.) amazonensis*. Finally, anti-BnSP-7 antibodies were used to construct a nanocomposite modified graphite immunosensor, that could detect BnSP-7 and targets in *L. (L.) amazonensis* extract. These data suggest that anti-BnSP-7 IgY is an important tool for discovering new parasite targets, blocking parasitic effects and serving as a diagnostic tool.

Keywords: *Bothrops pauloensis*; Phospholipase A₂, Snake venom, *Toxoplasma gondii*, *Leishmania (Leishmania) amazonensis*

1.0 - Introdução

1.1 - Toxoplasmose

A toxoplasmose é a protozoonose com maior difusão mundial, atingindo mais de um terço da população humana (MAROBIN et al., 2004; ELSHEIKHA, 2008; LALIBERTÉ e CARRUTHERS, 2008; DUBEY, 2010). No entanto, essa prevalência é variável e depende de fatores climáticos, socioeconômicos, culturais, hábitos higiênicos e até mesmo antropológicos como a idade e sistema imunológico (PAPPAS et al., 2009; WILKING et al., 2016; BAHIA-OLIVEIRA et al., 2017). Os mais comuns são os fatores antropogênicos, como hábitos alimentares e culturais como o consumo de carnes cruas ou malcozidas contendo cistos teciduais do parasita; pelo contato direto com as fezes de felídeos jovens infectados, qualidade da água e cobertura sanitária (DUBEY, 1997; JONES et al., 2009). Além disso, fatores climáticos afetam a sobrevivência de oocistos no ambiente e, portanto, altas prevalências são classicamente observadas em países tropicais com clima úmido e quente e, inversamente, menores prevalências são encontradas em países áridos ou regiões mais frias (ELMORE et al., 2012; GUO et al., 2015).

É descrito que mais de 40 milhões de pessoas nos Estados Unidos podem estar infectadas (CDC, 2018; EGOROV et al., 2018). No Brasil, é relato soroprevalência que podem alcançar 95% em populações indígenas da região Amazônica, 53,2% de prevalência no Rio Grande do Sul (BOIA et al., 2008; ARAÚJO et al., 2018).

O agente etiológico da toxoplasmose é o *Toxoplasma gondii*, parasita intracelular obrigatório e é considerado um dos patógenos mais bem-sucedidos do mundo (BLADER e KOSHY, 2015). É capaz infectar aves, mamíferos e humanos, e ainda tem a capacidade de se multiplicar na maioria das células desses hospedeiros (DUBEY, 1993). Isto justifica sua ampla distribuição e elevada soroprevalência. Sendo um dos mais abundantes parasitos eucariontes em humanos (TENTER et al., 2000).

T. gondii faz parte do filo Apicomplexa, classe Sporozoa, subclasse Coccidia, ordem Eucoccidia e família Sarcocystidae (REY, 2001). O filo Apicomplexa é representado por inúmeros protozoários patogênicos de relevância médica e

veterinária, por isso o estudo e a busca por novas estratégias para combater esses parasitas estão constantemente sendo exigidas (BESTEIRO, 2012).

Os parasitos pertencentes ao filo Apicomplexa apresentam como característica uma estrutura denominada complexo apical, importante para os mecanismos de adesão e invasão do parasita na célula hospedeira (WHITELAW et al., 2017; JONES et al., 2017). A designação do parasita é devido a sua forma arqueada, originada do grego onde *toxon* significa arco (BLACK e BOOTHROYD, 2000) e do nome do roedor (*Cterodactylus gondii*) onde o parasita foi isolado.

T. gondii possui três formas evolutivas conhecidas: taquizoítas, bradizoítas e esporozoíta (KAWAZOE, 2005). Os taquizoítas representam a forma de multiplicação rápida do parasita na célula hospedeira (MONTROYA e LIESENFELD, 2004). Apresentam forma em “arco” ou “meia lua” que, por vezes torna-se arredondada. São vulneráveis aos fatores de defesa do hospedeiro e, por isso, são estudados como alvos preferenciais para a escolha, ação e desenvolvimento de medicamentos (KIM e WEISS, 2004; RADKE et al., 2006). São vistos na fase aguda da infecção distribuída pelo sistema circulatório e tem a capacidade de infectar vários tecidos (REMINGTON et al., 2001; NISHIKAWA et al., 2008; TENTER, 2009).

Os bradizoítos são organismos de proliferação lenta ou de repouso nos cistos do *Toxoplasma* e se desenvolvem durante a infecção crônica (NEVES, 2004). Tais cistos podem ter tamanho variável, podem estar presentes em qualquer tecido do hospedeiro, porém são mais frequentes nos músculos esquelético e cardíaco, tecido nervoso e região ocular (MONTROYA e LIESENFELD, 2004; NISHIKAWA et al., 2008; SKARIAH et al., 2010). Intacto, o cisto pode persistir no hospedeiro sem causar nenhum dano, representando reservatório da infecção. (REMINGTON et al., 2001; ELSHEIKHA, 2008).

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

O ciclo de vida do *T. gondii* é complexo, heteroxênico e infecta, todas as espécies de animais homeotérmicos como aves e mamíferos, inclusive o homem (SILVA et al., 2003). Os gatos domésticos e outros felídeos são os únicos

hospedeiros definitivos, mas muitas espécies de vertebrados servem como hospedeiros intermediários (MARTINS e VIANA, 1998; HILL et al., 2005). Seu ciclo de vida é dividido entre infecções em felinos e não felinos, que estão relacionadas com a replicação sexuada e assexuada desse parasita, respectivamente (BLACK e BOOTHROYD, 2000; MORRISON E HÖGLUND, 2005) (Figura 1).

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

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

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

Os esporozoítos que são liberados a partir dos oocistos irão infectar o epitélio intestinal e diferenciar-se no estágio de taquizoíto. O parasita em sua forma de taquizoíto penetra ativamente nas células nucleadas do hospedeiro intermediário, replicam dentro de uma célula exponencialmente até romperem a célula e serem

liberados na corrente sanguínea, caracterizando a fase aguda da doença (DUBEY, 1997).

Os taquizoítos se diferenciam em bradizoítos mediante as pressões da resposta imune para formar cistos. Os bradizoítos persistem dentro dos cistos sem ocasionar sintomatologia no hospedeiro (BLADER et al., 2015). Essa imunidade impede a progressão da infecção e o desenvolvimento de novas lesões, porém não erradica os cistos já existentes encontrados em vários tecidos, como o tecido muscular e nervoso. Diante da ingestão desses cistos presentes em carne crua ou malcozida de hospedeiros, os bradizoítos irão infectar o epitélio intestinal do próximo hospedeiro susceptível e diferenciar-se novamente em estágio de taquizoíto para completar o ciclo assexuado (DUPONT et al., 2012).

Se a ingestão desses cistos for pelo gato, os bradizoítos podem se diferenciar em estágios sexuais, completando assim totalmente seu ciclo de vida (BLACK e BOOTHROYD, 2000).

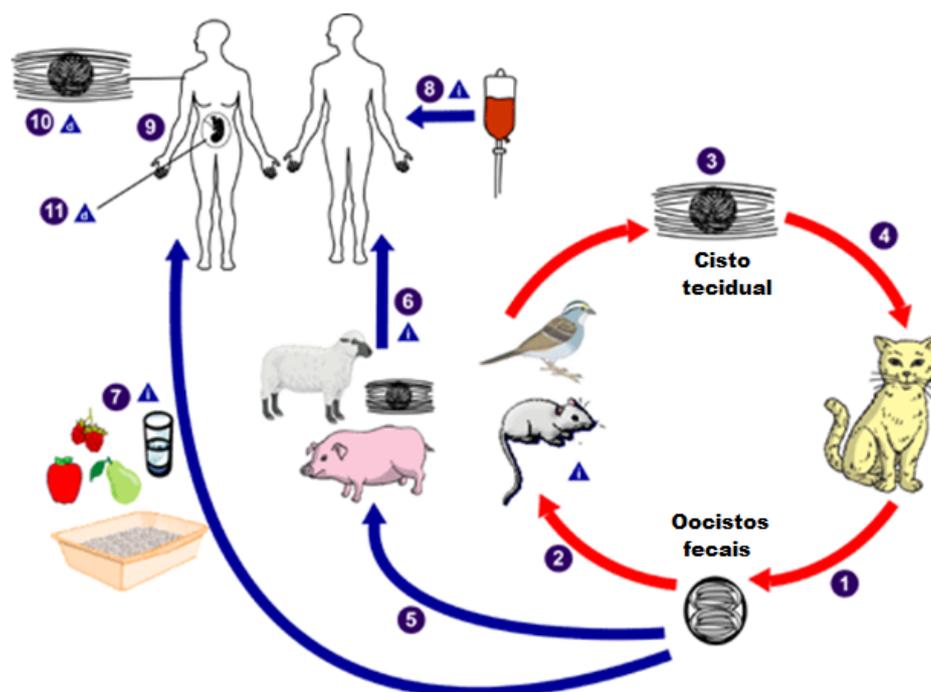


Figura 1: Representação esquemática do ciclo de infectividade do parasita *Toxoplasma gondii*. 1- Oocistos esporulados são eliminados nas fezes do gato; 2 - Hospedeiros intermediários na natureza (incluindo aves e roedores) podem ser infectados após ingerir água ou material vegetal contaminado

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

Manifestações clínicas e gravidade da doença estão diretamente relacionadas com interações entre parasito e hospedeiro, o que inclui: quantidade e via de inóculo, imunidade, virulência da cepa, genótipo, idade e integridade de mucosas e barreiras epiteliais do hospedeiro (MENDEZ e KOSHY, 2017). A infecção pelo parasito é assintomática na maioria dos adultos e crianças, sendo que apenas aproximadamente 10% dos casos apresentam sintomas não específicos que raramente precisam de tratamento (MONTROYA e LIESENFELD, 2004; DUBEY e JONES, 2008).

No entanto, a doença é considerada um problema de saúde pública, pois desenvolve um quadro preocupante em pacientes imunocomprometidos (por exemplo, pacientes com AIDS ou aqueles submetidos à terapia de droga imunossupressora para o câncer ou para o transplante de órgãos) e em casos de infecção congênita (HO-YEN, 2009; WEISS e DUBEY, 2009; MARTIN-IGUACEL et al., 2017). A infecção pelo *Toxoplasma gondii* pode causar complicações graves, como encefalite necrosante, pneumonite e miocardite (BARBOSA et al., 2007; CARRUTHERS e SUZUKI, 2007; NOVOSELOV et al., 2007), até mesmo a morte (CASTILHO-PELLOSO et al, 2007; YUAN et al., 2007).

1.2 – Leishmaniose

As doenças tropicais negligenciadas são um grupo diversificado de doenças transmissíveis que prevalecem em condições tropicais e subtropicais em 149 países, afetando mais de um bilhão de pessoas e causam mais de 35.000 mortes por dia em todo o mundo (COHEN et al., 2016; WHO, 2019). Essas doenças são

complexas e envolvem vários fatores associados a questões geográficas, ambientais, econômicas e sociais e por este motivo, se tornaram uma preocupação global de saúde pública e exigem intervenção multidisciplinar para conter a prevalência em muitas partes do mundo (WENG et al., 2018; WHO, 2019)

Dentre as várias doenças tropicais negligenciadas, a Leishmaniose é classificada entre as sete prioridades da Organização Mundial de Saúde, ocupando o segundo lugar em mortalidade e o quarto em morbidade entre as infecções tropicais (BERN et al., 2008). As leishmanioses ocorrem nos quatro continentes afetando principalmente populações pobres na África, Ásia e América Latina e consideradas endêmica em 98 países (WHO, 2017) atingindo 12 milhões de pessoas (ALVAR et al., 2012) (Figura 2).



Figura 2: Status de endemidade da leishmaniose cutânea (WHO 2017)

Esta doença é caracterizada pela infecção por várias espécies de parasitos do gênero *Leishmania spp.* O gênero *Leishmania spp.* engloba protozoários unicelulares pertencentes ao Sub-Reino Protozoa, filo Euglenozoa, ordem Kinetoplastida e da família Trypanosomatidae (LAINSON et al., 1998; SHAW, 2006; BAÑULS et al., 2007). A infecção ocorre durante o ciclo de vida destes organismos, os quais transitam entre um hospedeiro vertebrado e um inseto vetor, apresentando

as formas amastigotas – com flagelo recorrente, imóveis e encontradas no interior de células do sistema fagocítico mononuclear de vertebrados, e as formas promastigotas - flageladas localizadas no trato digestivo do inseto vetor (MIRANDA *et al.*, 2007). A transmissão é realizada por flebotomíneos fêmeas, presentes no velho mundo (*Phlebotomus*) e no novo mundo (*Lutysomyia*) (ROSS, 1903; GRIMALDI e TESH, 1993; GONTIJO e CARVALHO, 2003; HANDLER *et al.*, 2015).

O gênero *Leishmania* é subdividido em dois subgêneros, *Leishmania* e *Viannia*, de acordo com o local do desenvolvimento das formas promastigotas no trato digestório do inseto vetor. As espécies pertencentes ao sub-gênero *Leishmania* desenvolvem-se de forma exclusiva na porção média e anterior do intestino dos flebotomíneos e as espécies do subgênero *Viannia*, além do seu desenvolvimento nas porções anterior e média, apresentam longa permanência no intestino posterior na região do piloro dos flebotomíneos (LAINSON e SHAW, 1998; SHAW, 2006).

A leishmaniose ocorre em três formas principais, devido a elevada variabilidade de sintomas e quadros clínicos: (1) **Leishmaniose cutânea**: causa feridas na pele e úlceras crônicas. Geralmente é autolimitada, mas pode ser uma doença crônica e progressiva em uma proporção de casos; (2) **Leishmaniose mucosa**: causada por espécies de *Leishmania* na África e nas Américas, que afetam a mucosa nasal, oral e faríngea; (3) **Leishmaniose visceral** afeta o baço, fígado, medula óssea e linfonodos, produzindo febre e anemia. Geralmente é fatal se não for tratada (WHO 2019). No Continente Americano podemos atribuir a seguinte denominação: leishmaniose tegumentar americana (LTA) e leishmaniose visceral americana (LVA) (PONTES, 2008)

A espécie do parasito infectado é determinante para a diferenciação entre leishmaniose cutânea e visceral. Atualmente o gênero *Leishmania*, compreende cerca de 30 espécies conhecidas, das quais 21 são patogênicas aos humanos (DANTAS-TORRES, 2006; LESSA *et al.*, 2007; WHO, 2016). No Brasil, entre as espécies de *Leishmania* causadoras da forma cutânea da doença, seis pertencem ao subgênero *Viannia* e uma ao subgênero *Leishmania*, sendo as principais *L. (Viannia) braziliensis*, *L. (Viannia) guyanensis* e *L. (Leishmania) amazonensis* (GUEDES *et al.*, 2008; COSTA *et al.*, 2011) (Figura 3).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que 1,3 milhões de novos casos de leishmanioses ocorram todo ano. Mais de 90% de todos os casos de leishmaniose cutânea ocorrem no Afeganistão, na Argélia, no Brasil, na Colômbia, na República Islâmica do Irã, no Peru, na Arábia Saudita e na República Árabe da Síria (WHO, 2019).

Estado de endemicidade da leishmaniose cutânea no mundo todo, 2016

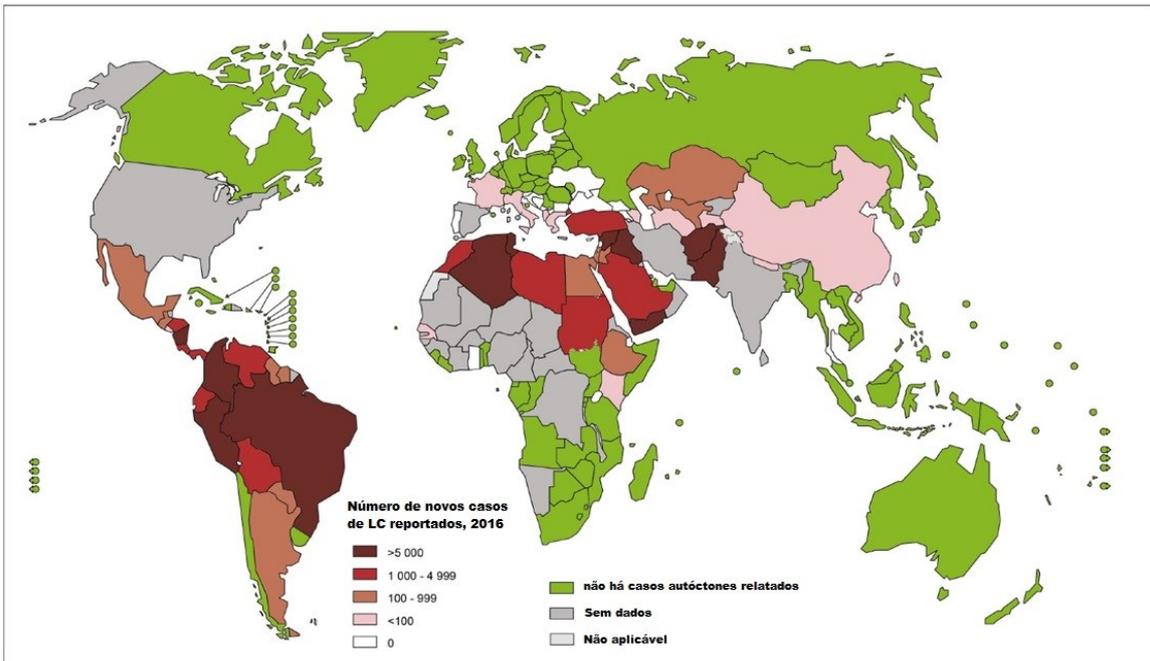


Figura 3: Distribuição geográfica da leishmaniose cutânea. Fonte: WHO, 2016

O ciclo biológico de *Leishmania* é heteroxênico, necessitando de dois hospedeiros, sendo um deles o invertebrado, representado pelo inseto vetor, e por um hospedeiro vertebrado, mamíferos representados por humanos, canídeos silvestres e domésticos, marsupiais e roedores (SCHLEIN, 1993). Durante o seu ciclo de vida, estes parasitos alternam entre as formas promastigota e amastigota. As promastigotas são formas móveis e flageladas, altamente infectivas, que apresentam vida-livre e são encontradas no trato digestório do inseto (GONTIJO e MELO, 2004). Por outro lado, as formas amastigotas não-flageladas, são organismos intracelulares obrigatórios encontrados principalmente nos vacúolos de

fagócitos, sendo encontrados em diversos tecidos do hospedeiro vertebrado (HANDLER et al., 2015).

O ciclo de vida inicia-se quando o flebotomíneo, durante o repasto sanguíneo, inocula as formas promastigotas metacíclicas na derme que são fagocitadas por macrófagos onde se diferenciam em formas amastigotas. O parasita se desenvolve e se multiplica por divisão binária, e infecta outras células do sistema mononuclear fagocitário (NIEVES e PIMENTA, 2000; CDC, 2015). Nas fêmeas de flebotomíneos, o parasita não se encontra no meio intracelular e sim na luz do trato digestivo, onde as formas amastigotas, ingeridas durante o repasto sanguíneo se diferenciam morfológica e bioquimicamente em formas flageladas, as formas promastigotas, são posteriormente inoculadas na pele dos mamíferos durante a picada (GONTIJO e CARVALHO,2003) (Figura 4).

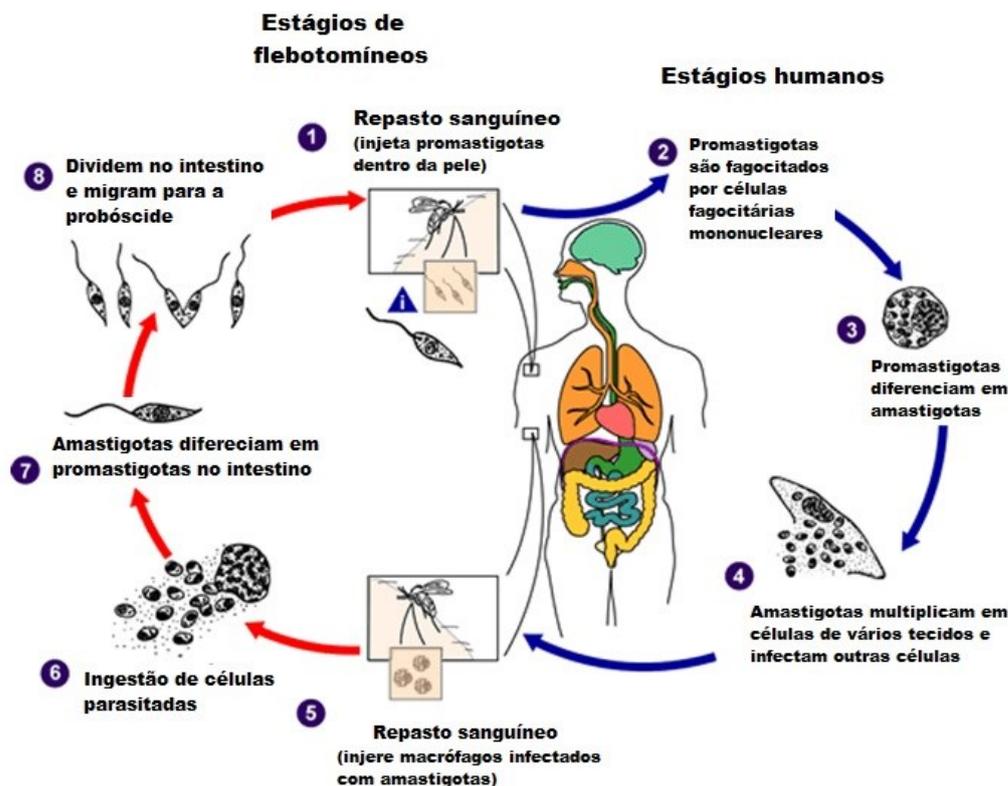


Figura 4: Ciclo de vida de *Leishmania* spp. (1) - A leishmaniose é transmitida pela picada de flebotomíneos infectados. Os flebotomíneos injetam promastigotas de sua probóscide durante o repasto sanguíneo; (2) - Promastigotas que atingem a ferida são fagocitadas por macrófagos e outros tipos de células fagocíticas mononucleares; (3) - Os promastigotas transformam-se nestas células em amastigotas, (4) que se multiplicam por divisão simples e prosseguem para infectar outras células fagocíticas mononucleares; (5 e 6) - Os flebotomíneos são infectados pela ingestão

de células infectadas durante o repasto sanguíneo; (7) - Nos flebotomíneos, os amastigotas se transformam em promastigotas, desenvolvem-se no intestino; (8) (no intestino posterior para leishmanias no subgênero *Viannia*; no intestino médio para leishmanias do subgênero *Leishmania*), e migram para probóscide. Fonte: adaptado de <https://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/biology.html>

1.3 – Leishmaniose e Toxoplasmose: Um problema de saúde pública

Para analisarmos o sucesso de qualquer parasita, é importante qualificar os distúrbios que ele causa a um hospedeiro, bem como a sua capacidade de adaptar e integrar ao ambiente do hospedeiro (DE MORAIS et al., 2015). Eles desenvolveram ao longo dos milhares de anos de evolução muitos mecanismos para escapar das consequências das respostas do sistema imune de seus hospedeiros (PINON et al., 2001; TIZARD et al., 2002). Delicadas adaptações do parasito com o hospedeiro asseguram a sobrevivência do parasito sem induzir doença no hospedeiro (TENTER et al., 2000; LANG et al., 2007; CARRUTHERS e BOOTHROYD, 2007).

Leishmania ssp. e *T. gondii*, assim como outros parasitas desfrutam de um estilo de vida intracelular livre de muitas repostas do sistema imune do hospedeiro, com as quais outros microorganismos extracelulares se deparam (MONTOYA e LIESENFIELD, 2004; DUBEY e JONES, 2008). Na leishmaniose, por exemplo, a doença pode não manifestar sintomas durante um período. Esse período de latência é, em média, de dois a três meses, podendo variar de duas semanas a dois anos com períodos assintomáticos aumentando o risco de transmissão adicional do parasita. Pacientes com doença assintomática geralmente apresentam baixos títulos de anticorpos, dificultando a detecção da doença com técnicas padronizadas (FURTADO, 1994).

Em *T. gondii*, a infecção pelo parasito é assintomática na maioria dos adultos e crianças, sendo que apenas aproximadamente 10% dos casos apresentam sintomas não-específicos que raramente precisam de tratamento (MONTOYA e LIESENFIELD, 2004; DUBEY e JONES, 2008). No entanto, a doença é considerada um problema de saúde pública, pois desenvolve um quadro preocupante em pacientes imunocomprometidos (por exemplo, pacientes com

AIDS ou aqueles submetidos à terapia de droga imunossupressora para o câncer ou para o transplante de órgãos) e em casos de infecção congênita. A infecção pelo *Toxoplasma gondii* pode causar complicações graves, como encefalite necrosante, pneumonite e miocardite (BARBOSA et al., 2007; CARRUTHERS e SUZUKI, 2007; NOVOSELOV et al., 2007), até mesmo a morte (CASTILHO-PELLOSO et al, 2007; YUAN et al., 2007).

O diagnóstico precoce é crítico para o sucesso do tratamento atual dessas doenças, que apresentam uma série de efeitos adversos incluindo baixa especificidade, toxicidade e resistência a drogas (CARRUTHERS, 2006; BAATZ et al., 2006). Portanto, é importante descobrir novos medicamentos ou ferramentas que possibilitem a descoberta de possíveis alvos capazes de atuar sobre o parasita. Segundo a OMS, a detecção, o tratamento e os cuidados associados a leishmaniose podem necessitar de investimentos de aproximadamente 100 milhões de dólares (80 – 130 milhões de dólares) por ano durante o período de 2015- 2030. Estes dados reafirmam, portanto, o grande impacto financeiro que as leishmanioses podem gerar para o Sistema de Saúde Pública (WHO, 2015). Portanto, é importante descobrir novos medicamentos ou ferramentas que possibilitem a descoberta de possíveis alvos capazes de atuar sobre o parasita.

A falta de atenção dada a essas doenças é desproporcional à sua importância global. A maioria das pessoas infectadas com Leishmaniose e Toxoplasmose, é confrontada com más condições sanitárias, tem nutrição e cuidados de saúde inadequados e não podem pagar pelo tratamento, mesmo que estejam disponíveis (CONTEH et al., 2010). E por esta razão, elas têm sido amplamente ignoradas por fabricantes de medicamentos e formuladores de políticas públicas por décadas, por não trazerem retornos econômicos suficientes, de modo que existe pouco incentivo para estimular seu interesse comercial pela pesquisa e desenvolvimento (WENG et al., 2018).

Neste cenário, um ponto importante a se considerar é a necessidade de novos métodos e materiais que possibilitem um diagnóstico precoce e que seja barato, rápido e eficiente. Um bom alvo interesse para o desenvolvimento de novas ferramentas terapêuticas seria a detecção das PLA₂s, uma vez que o parasito secreta essa enzima para iniciar o seu processo de infecção. Estudos utilizando anticorpos anti-PLA₂s demonstram-se promissores permitindo o surgimento de

novas pesquisas que visam o entendimento de patologias cujas PLA₂s estejam envolvidas (PASSERO et al., 2008; PSZENNY et al., 2016; WILSON e KNOLL, 2018; SCHULTZ e CARRUTHERS, 2018).

1.4 - Classificação e características estruturais e funcionais das fosfolipases

Fosfolipases (PLs) são um grupo complexo e importante de enzimas que participam no metabolismo de fosfolipídios, os quais são componentes essenciais das membranas celulares. Essas enzimas geralmente se associam primeiro com a membrana ou micela ou frequentemente estão ligadas a elas (DENNIS, 2015).

A maioria das células contém uma grande quantidade de fosfolipases que podem existir como formas secretadas, associadas à membrana ou localizadas intracelularmente (ALOULOU et al., 2018). As PLs pertencem a classe das hidrolases que catalisam a hidrólise de ligações éster e ésteres de fosfato em fosfolipídios, predominantemente sobre glicerofosfolipídeos, degradando também lipídios neutros (DENNIS, 1983).

Entre os fosfolipídios naturais, a fosfatidilcolina ou lecitina é o substrato mais comum das fosfolipases cataliticamente ativas. No entanto, eles também podem atuar em fosfatidiletanolamina, fosfatidilinositol, esfingomielina, lisofosfatidilcolina e lisofosfatidilinositol em alguns organismos e tecidos (SINGER et al., 1997). Embora todas as fosfolipases tenham como substrato fosfolipídios, elas variam no local de ação da molécula de fosfolipídios, sua função e sua regulação. Dependendo posição que elas hidrolisam no esqueleto fosfolipídico, as fosfolipases são classificadas em cinco tipos: A₁ (PLA₁), A₂ (PLA₂), B (PLB), C (PLC) e D (PLD) (DENNIS, 1983), liberando uma variedade de produtos como lisofosfolipídios (LPL), ácidos graxos livres (AGL), diacilgliceróis (DG), fosfato de colina, fosfoinosítídeos e ácido fosfatídico, entre outros (Figura 5).

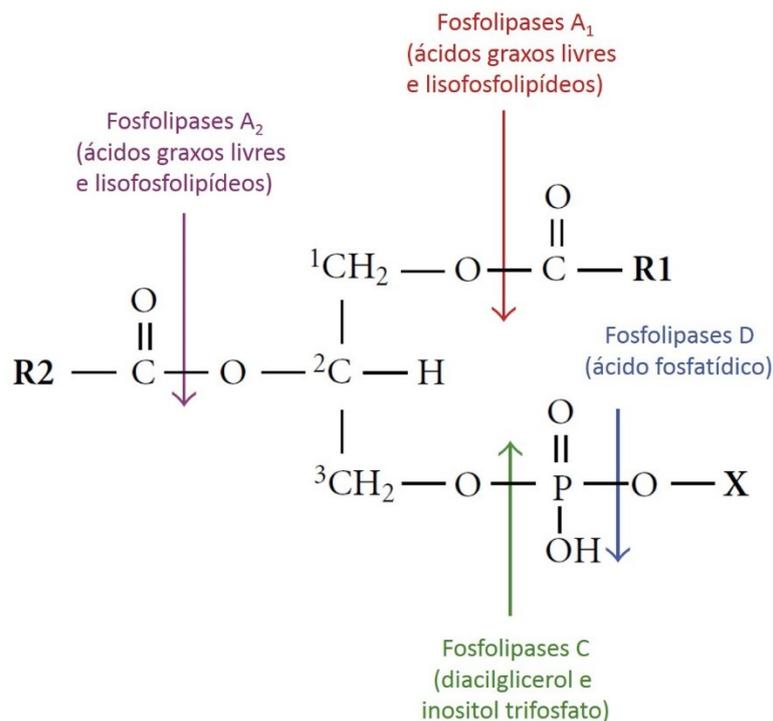


Figura 5: Hidrólise de fosfolípidios por fosfolipases. As setas indicam os locais de ataque por clivagem hidrolítica de fosfolipases tipo A₁, A₂, C e D. Os principais produtos gerados por sua ação também são mostrados. R1 / R2: ácidos graxos livres nas posições sn-1 ou sn-2; X: colina, etanolamina, serina, inositol e assim por diante. Fonte: Belaunzarán et al., 2011

Em geral, as fosfolipases hidrolisam fosfolípidios com atividade de acil-hidrolase ou fosfodiesterase. A fosfolipase A₁ (PLA₁), A₂ (PLA₂) e a B (PLB) constituem as acil-hidrolases, enquanto as fosfodiesterases são representadas pela fosfolipase C (PLC) e pela fosfolipase D (PLD) (CERMINATI et al., 2019).

Estas enzimas são amplamente distribuídas nos diversos organismos vivos como animais, plantas, bactérias, protozoários, parasitas (NIEWERTH e KORTING, 2001; ALOULOU et al., 2018; WILSON e KNOLL, 2018) e estão implicadas em variados processos, dentre eles: a homeostase de membranas, a aquisição de nutrientes e a geração de moléculas bioativas (KÖHLER et al., 2006).

As PLs tipo A (PLAs) catalisam a reação para a remoção lipolítica de uma porção de ácido graxo esterificado ao glicerol (NIEWERTH e KORTING, 2001). As isoenzimas dessa classe são as PLA₁ e PLA₂, diferenciadas pela posição da ligação

éster dos fosfolipídios e pelos lisofosfolipídios liberados como produtos (SMITH et al., 1973).

As fosfolipases A₁ hidrolisam especificamente os grupos acil de fosfolipídios na posição sn-1, produzindo ácidos graxos livres e lisofosfolipídios (DENNIS, 1983; INOUE et al., 2005). Estão presentes em vários tipos celulares e teciduais a partir de uma vasta gama de organismos. Mas apesar de sua aparente diversidade e abundância, um número limitado de PLA₁s foram isoladas e caracterizadas bioquimicamente (ISHIGURO et al., 2001; SONODA et al., 2002; RICHMOND e SMITH, 2007). Em mamíferos foram descritas nove moléculas de PLA₁, sendo seis enzimas extracelulares e três intracelulares (AOKI et al., 2007). As PLA₁ extracelulares pertencem à família dos genes das lipases pancreáticas, que são conservadas em uma extensa gama de organismos, de insetos a mamíferos e caracterizados e classificados bioquimicamente, de acordo com suas especificidades de substratos, estruturas, padrões de expressão e possíveis funções (AOKI et al., 2007).

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

As fosfolipases A₂ são as mais amplamente estudadas com maiores avanços acerca de estrutura e função (DENNIS, 1997; HIRABAYASHI et al., 2004; SCHALOSKE e DENNIS, 2006; BURKE e DENNIS, 2009). A atividade enzimática agora caracterizada como atividade da PLA₂ foi primeiramente estudada em detalhes em 1890, usando "veneno" ou peçonhas de serpentes (STEPHENS et al., 1898) e posteriormente em peçonha de cascavel (DENNIS, 2011).

A superfamília da fosfolipase A₂ (PLA₂), quando são ativadas nas células, catalisam a hidrólise da ligação éster na posição sn-2 dos fosfolipídios da membrana, que são geralmente enriquecidos em ácido araquidônico e outros ácidos graxos poliinsaturados (KINI et al., 2003; HIGUCHI et al., 2007; BUCZYNSKI et al., 2009). Os produtos de hidrólise da reação da PLA₂ são ácidos graxos livres e lisofosfolipídeos. Ambos os produtos representam precursores para moléculas sinalizadoras que desempenham papéis fisiológicos importantes.

O ácido araquidônico quando liberado desencadeia uma cascata de processos celulares que envolvem cicloxigenases e lipoxigenases que são enzimas

chave na biossíntese de eicosanóides incluindo leucotrienos, prostaglandinas e tromboxanos (FUNK, 2001). Os eicosanóides desempenham um papel em uma ampla gama de processos fisiológicos e patológicos, como regulação do sono, respostas imunes, inflamação e percepção da dor. Os eicosanóides atuam através da ligação a receptores acoplados à proteína G específicos (TSUBOI et al., 2002).

O outro produto da ação da PLA₂, o lisofosfolípídeo, pode servir como um precursor para mediadores lipídicos, como o ácido lisofosfatídico ou o fator ativador de plaquetas (PAF). O ácido lisofosfatídico está envolvido na proliferação celular, sobrevivência e migração (MOOLENAAR et al., 1997; MOOLENAAR et al., 2004; RIAZ et al., 2016). O PAF é um potente mediador lipídico inflamatório (VENABLE et al., 1993; PRESCOTT et al., 2000; MIN et al., 2001).

A superfamília da PLA₂ compreende um número de proteínas altamente distintas que podem ser divididas em seis categorias principais: citosólicas (cPLA₂), independente de cálcio (iPLA₂), fator ativador de plaquetas acetil-hidrolase (PAF-AH), lisossomais (LPLA₂), específicas do tecido adiposo (AdPLA₂) e secretadas (sPLA₂) (DENNIS et al., 2011) (Tabela 1). A atribuição das enzimas a um determinado grupo baseia-se no mecanismo catalítico, peso molecular, bem como suas características funcionais e estruturais (BURKE e DENNIS, 2009; DENNIS et al., 2011).

Tabela 1: Super famílias das fosfolipases A₂

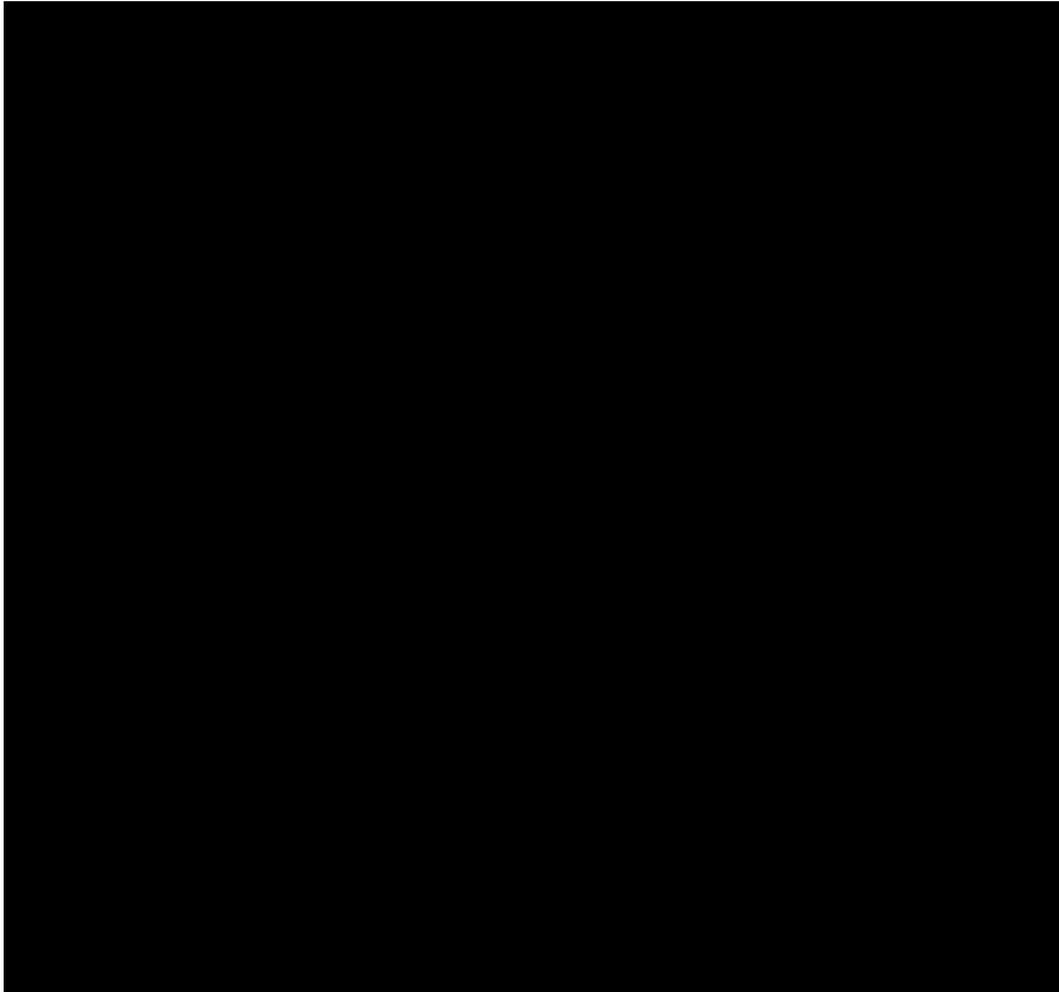


Tabela adaptada de DENNIS et al., 2011

As cPLA₂ hidrolisam principalmente glicerofosfolipídeos incluindo a fosfatidilcolinas, fosfatidiletanolaminas e o ácido araquidônico na posição sn-2, possuem ação catalítica dependente de Ca²⁺ e sua massa molecular elevada pode variar entre 61 a 114 kDa (BURKE e DENNIS, 2009). Essas enzimas são amplamente distribuídas nas células da maioria dos tipos de tecido humano e contêm uma díade catalítica de Ser-Asp (DESSEN et al., 1999).

As PLA₂s independentes de Ca²⁺ (iPLA₂s) são enzimas intracelulares expressas ubiquamente que não requerem atividade de Ca²⁺ e possuem uma massa molecular elevada (85-88 KDa). O sítio catalítico de iPLA₂s é semelhante ao cPLA₂s e elas não demonstram especificidade para o substrato, manifestando atividades de PLA₂/PLA₁, lisofosfolipase, transacilase e tioesterase (LIO e DENNIS, 1998; JENKINS et al., 2004; JENKINS et al., 2006; CARPER et al., 2008;

RAMANADHAM et al., 2015). As iPLA₂s participam em uma infinidade de processos biológicos, incluindo catabolismo de gordura, diferenciação celular, manutenção da integridade mitocondrial, remodelação de fosfolipídios, proliferação celular, transdução de sinal e morte celular (HERMANSSON et al., 2016).

As acetil-hidrolases de fatores ativadores de plaquetas (PAF-AH) possuem uma serina catalítica, realizam a hidrólise de grupos acetato da posição sn-2 de fatores ativadores de plaquetas (SCHALOSKE e DENIS, 2006), e não requerem Ca²⁺ para catálise. Podem ser encontradas com abundância em mamíferos, em locais como sistema nervoso central e em eritrócitos (BURKE e DENNIS, 2009), e são mediadores fosfolipídicos que desempenham um papel importante na coagulação e nas vias inflamatórias (PRESCOTT et al., 2000).

As LPLA₂s esterificam um grupo acil com um grupo hidroxil na posição C-1 de ceramidas, onde os fosfolipídeos atuam funcionalmente como doadores de radicais acil (ABE e SHAYAMAN, 1998). Esta enzima contém uma tríade Ser-His-Asp conservada e tem quatro resíduos de cisteína que são necessários para a atividade catalítica (HIRAOKA et al., 2005). Dois tipos distintos de PLA₂s lisossomais foram identificados: PLA₂ independente de Ca²⁺ (aiPLA₂) e PLA₂ lisossômica (LPLA₂) (KITSIOULI et al., 2009).

As PLA₂ tecido adiposo específicas (AdPLA₂) são expressas no tecido adiposo e catalisam a amplificação de ácidos graxos livres e lisofosfolipídeos a partir da fosfatidilcolina, realizando a hidrólise preferencialmente na posição sn-2 de fosfolipídeos, cuja atividade no metabolismo adipogênico é relevante (DUNCAN et al., 2008; JAWORSKI et al., 2009).

Dentre as seis categorias principais as sPLA₂ estão entre as mais bem estudadas, pois são conhecidos há mais de um século a partir de estudos sobre peçonha de serpente e a enzima digestiva pancreática, e muitos estudos mecanísticos e inibitórios foram realizados em suas numerosas isoformas (DENNIS et al., 2011; DENNIS, 2015). A família de PLA₂ secretada (sPLA₂) são classificadas em 18 grupos principais (IA, IB, IIA, IIB, IIC, IID, IIE, IIF, III, V, IX, X, XIA, XIB, XIIA, XIIB, XIII e XIV) (Tabela 2) e vários subgrupos de acordo com critérios de homologia de sequência identificável (SIX e DENNIS, 2000).

Tabela 2: Família de PLA₂ secretadas

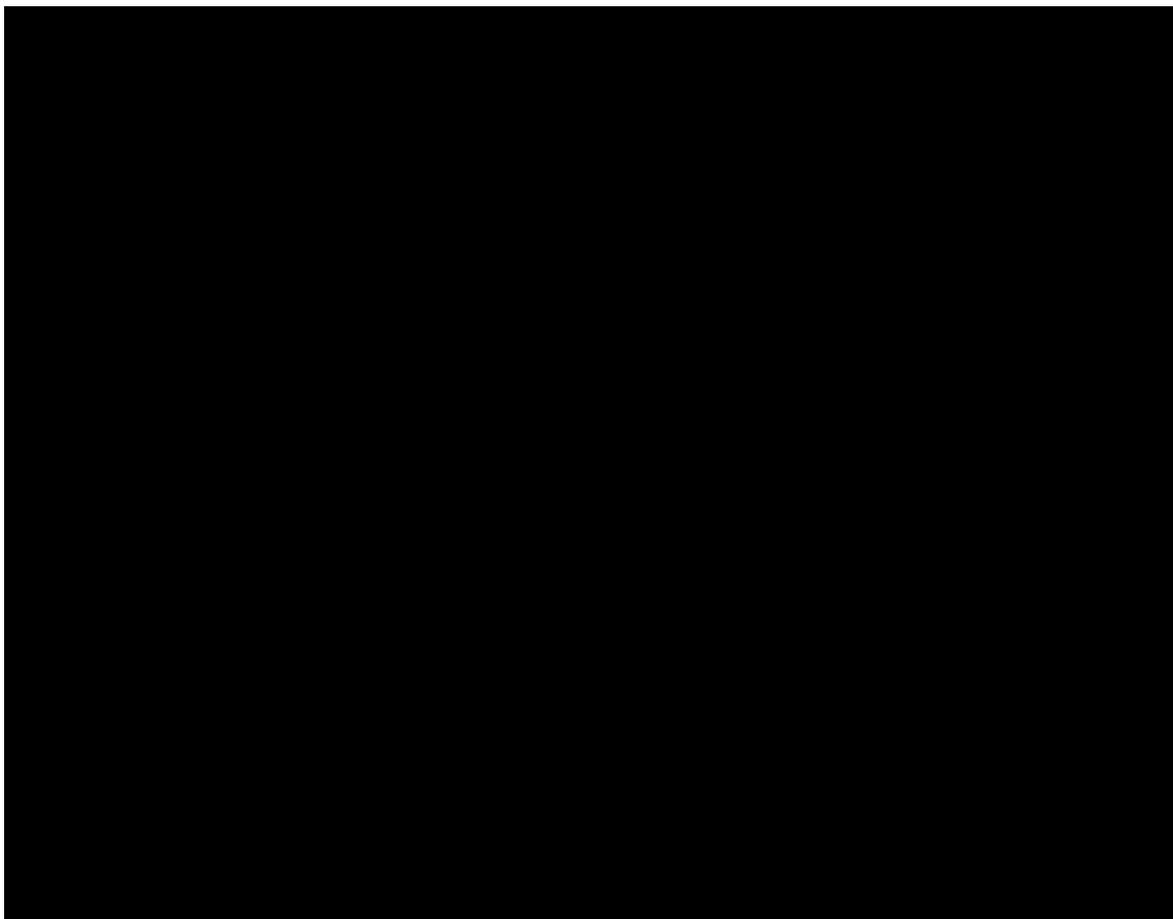


Tabela adaptada de DENNIS et al., 2011

São proteínas pequenas que variam de 14 a 18 kDa, apresentam de 6 a 8 pontes de dissulfeto. Este grupo de enzimas possui no sítio ativo uma histidina conservada na posição 48 e um aspartato conservado na posição 49, formando uma díade His/Asp catalítica. Também requerem pequenas concentrações de Ca²⁺ para sua atividade catalítica (SCHALOSKE e DENNIS, 2006) (Figura 6).

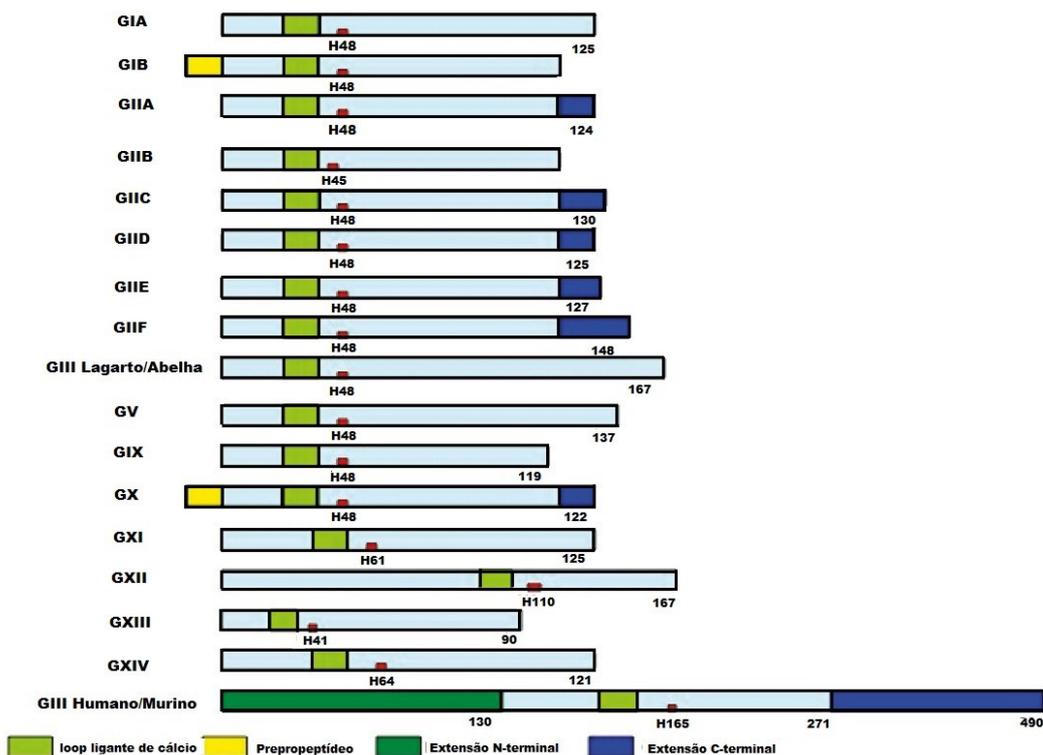


Figura 6: Apresentação esquemática de PLA₂s secretadas. Loops de ligação ao cálcio, sítios ativos (quadrados vermelhos) e resíduos de extensão do terminal N e C são mostrados. Fonte: DENNIS et al., 2011.

Essas enzimas são estocadas em grânulos citoplasmáticos, e são secretadas para o meio extracelular quando ocorre a estimulação (AKIBA e SATO, 2004). Porém, certas sPLA₂s também podem atuar intracelularmente antes de serem secretadas (MOUNIER et al., 2004; NI et al., 2006).

A família sPLA₂ contém múltiplas isoformas que exibem distribuições celulares/ teciduais únicas e seletividade de substrato (MURAKAMI et al., 2015), bem como funções fisiológicas distintas. Estão envolvidas na digestão, inflamação, geração de mediadores de lipídeos, multiplicação celular, exocitose, ação microbicida, entre outras (MONTECUCCO et al., 2008; LOMONTE e RANGEL, 2012; GUTIÉRREZ e LOMONTE, 2012).

Atualmente, as PLA₂ também podem ser atribuídas a 16 grupos e muitos subgrupos com base na sequência, massa relativa, origem, padrões de ligação dissulfeto, exigência de Ca²⁺, etc (BURKE e DENNIS, 2009; DENNIS et al., 2011).

As PLA₂ das peçonhas de serpentes estão incluídas nos grupos IA e IIA (SCHALOSKE e DENNIS, 2006). O grupo I inclui a família Elapidae e grupo II as famílias Viperidae e Crotalidae (LOMONTE, 2012). PLA₂s isoladas dessas peçonhas que pertencem ao grupo II são subdivididos em dois grupos principais: (i) cataliticamente ativas (PLA₂s Asp49), que exibem um resíduo Asp na posição 49, com relativamente elevada atividade catalítica sobre substratos artificiais; (ii) cataliticamente inativas (variantes PLA₂s Lys49), mostrando um resíduo Lys na posição 49, estas possuem baixa ou nenhuma atividade catalítica, porém podem perturbar a integridade das membranas e induzir efeitos farmacológicos (DÍAZ et al., 1991; RUFINI et al., 1992; LOMONTE et al., 2003; LOMONTE e RANGEL, 2012).

Algumas PLA₂s da peçonha de serpentes de víbora, apresentam outros substituintes de Asp49 como serina, asparagina ou arginina, e as enzimas são classificadas como homólogas de PLA₂ Ser49, Asn49 e Arg49, respectivamente. As PLA₂ Ser49 como a Ecafolin S, uma toxina de *Echis carinatus sochureki* (POLGAR et al., 1996) e Ammodytin L, de *Vipera ammodytes ammodyte* (KRIZAJ et al., 1991). Já as Asn49, são as TsR6 e CTs-R6 purificadas da peçonha de *Trimeresurus stejnegeri* e TM-N49 isolada em *Protobothrops mucrusquamatus* (PAN et al., 1998; TSAI et al., 2004), e por último as Arg49 tendo como única representante a Zhaoermiatoxin, descoberta na peçonha de *Zhaoermia mangshanensis* (WEI et al., 2006).

As PLA₂ Asp49 podem ainda ser subdivididas em básicas (pI próximo a 8,0) e ácidas (pI próximo a 4,0), devido a presença de um conteúdo maior de resíduos de aminoácidos básicos e ácidos, respectivamente em suas estruturas (KÖHLER et al., 2006).

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

Todas as PLA₂s catalíticas apresentam um resíduo de tirosina na posição 28, ao passo que uma asparagina ocupa esta posição em PLA₂-Lys49. Uma análise estrutural de Tyr28 em PLA₂s revela uma característica importante para a estabilidade de Ca²⁺ no sítio de ligação do cálcio com o qual está associado. Quando ocorre a mutação, este sítio se abre impossibilitando a ligação do íon. Assim, a inatividade catalítica das PLA₂-Lys49 pode ser explicada por duas substituições, Y28N e D49K (FERNANDES et al., 2010). As PLA₂s-Asp49 e Lys49 mostram semelhanças significativas em suas estruturas tridimensionais, embora exibindo diferentes propriedades farmacológicas, o que os torna alvos interessantes para muitas pesquisas.

A arquitetura molecular, bem como a maquinaria catalítica das PLA₂s de peçonhas de serpentes são altamente conservadas (DENNIS et al., 2011; GUTIÉRREZ e LOMONTE, 2012). No entanto, alterações sutis nos resíduos de aminoácidos expostos à superfície durante a evolução permitiram que as PLA₂s desencadeassem um amplo espectro de efeitos biológicos, adaptando gradualmente para o reconhecimento de alvos moleculares específicas, portanto, interferindo em diferentes processos fisiológicos (LOMONTE et al., 2010).

PLA₂s possuem catorze resíduos de Cys conservados que formam sete pontes dissulfeto, um padrão estrutural relevante para a estabilização da estrutura tridimensional (SCHALOSKE e DENNIS, 2006). Estas enzimas são constituídas por três grandes α -hélices e duas β -folhas anti-paralelas, que são mantidas juntas por pontes dissulfeto. As estruturas conservadas nas PLA₂s são uma α - hélice na região N- terminal, uma "curta" hélice, um *loop* de ligação ao cálcio, duas alfas hélices antiparalelas, um, *loop* C-terminal local ativo, e duas folhas- β anti-paralela (DENNIS et al., 2011; CORRÊA, 2007; DE LIMA et. al., 2017). (Figura 7A)

PLA₂s dos grupos I e II apresentam um sítio catalítico conservado formado por quatro resíduos de aminoácidos: His48, Asp49, Tyr52 e Asp99, ao lado de resíduos do "sítio de ligação do cálcio" (Figura 7B). O resíduo de aminoácido Asp49 é importante para a catálise, pois coordena o íon Ca²⁺, o qual desempenha um papel crucial para a atividade enzimática (PETAN et al., 2007). Durante o mecanismo catalítico, o íon Ca²⁺, impulsiona o reconhecimento do substrato no sítio ativo, polariza a ligação éster cindível e estabiliza o estado de transição (SCOTT et al., 1990).

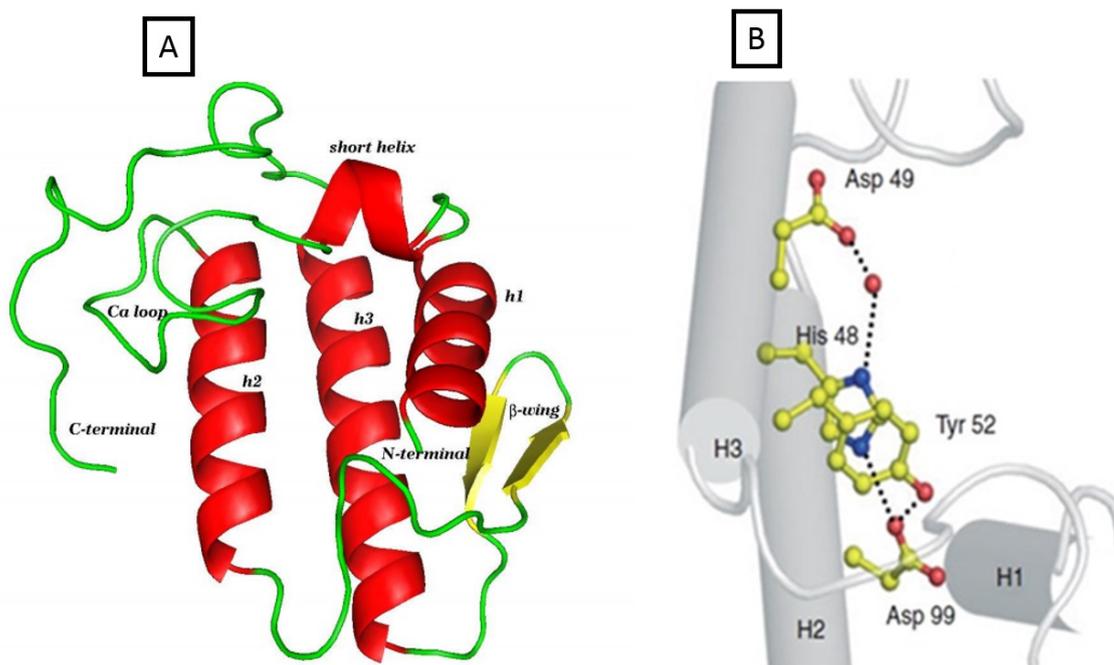


Figura 7: Representação estrutural tridimensional das fosfolipases. A- Estrutura do grupo II; B- sítio catalítico. Adaptado de KANG et al., 2011; SALVADOR et al., 2016.

Muitas PLA₂s de peçonha de serpente tem uma forte tendência a formar oligômeros, geralmente na forma de dímeros e, conseqüentemente, a maioria das suas estruturas foram resolvidas como homodímeros (ARNI et al., 1995; MAGRO et al., 2003; ANGULO et al., 2005). PLA₂s-Lys49 botrópicas são as proteínas mais estudadas deste grupo, e vários experimentos com estas proteínas demonstraram que são proteínas diméricas em solução (DA SILVA GIOTTO et al., 1998; ARNI et al., 1999; MURAKAMI et al., 2007; FERNANDES et al., 2010).

A dissociação de PLA₂ em monômeros demonstrou ser prejudicial para as suas atividades biológicas (DE OLIVEIRA et al., 2001; ANGULO et al., 2005), a sua montagem oligomérica parece ser relevante para a sua toxicidade. O estado dimérico também se encontra in vivo, e é estável mesmo após aquecimento na presença de β-mercaptoetanol (GIOTTO DA SILVA et al., 1998; SOARES et al., 2000).

A primeira estrutura de uma PLA₂s-Lys49 do gênero *Bothrops* foi resolvida por ARNI et al. (1995) e posteriormente várias outras tiveram suas estruturas 3D determinadas (DA SILVA GIOTTO et al., 1998; LEE et al., 2001; MAGRO et al.,

2003; WATANABE et al., 2005). Todas estas estruturas adotaram uma conformação dimérica comum (dímero convencional), que se estabilizam através de interações entre as folhas betas e resíduos da alfa hélice N-terminal (ARNI et al., 1995; MAGRO et al., 2003).

Silva-Giotto e colaboradores (1998) resolveram a estrutura da BthTX-I, uma PLA₂ Lys49 isolada da peçonha de *Bothrops jararacussu*, e apresentaram duas estruturas com diferentes ângulos de abertura entre os monômeros, referidos como conformações "aberta" e conformações "fechadas". Magro e colaboradores (2003) através de análises de oito estruturas de PLA₂s-Lys49 observaram que estas proteínas poderiam adotar muitas conformações devido à flexibilidade entre os monômeros e com base nesses dados foi proposto um novo modelo para a estrutura dimérica das PLA₂s-Lys49, referido como "dímero alternativo". Neste modelo os dímeros alternativos se estabilizam por meio do contato entre os *loops* de ligação de cálcio e os C-terminais formando uma via de conexão entre os sítios ativos de ambos os monômeros (MURAKAMI et al.,2007), sendo o aminoácido Tyr119 o responsável por manter essa conformação (DOS SANTOS et. al.,2009) (Figura 8).

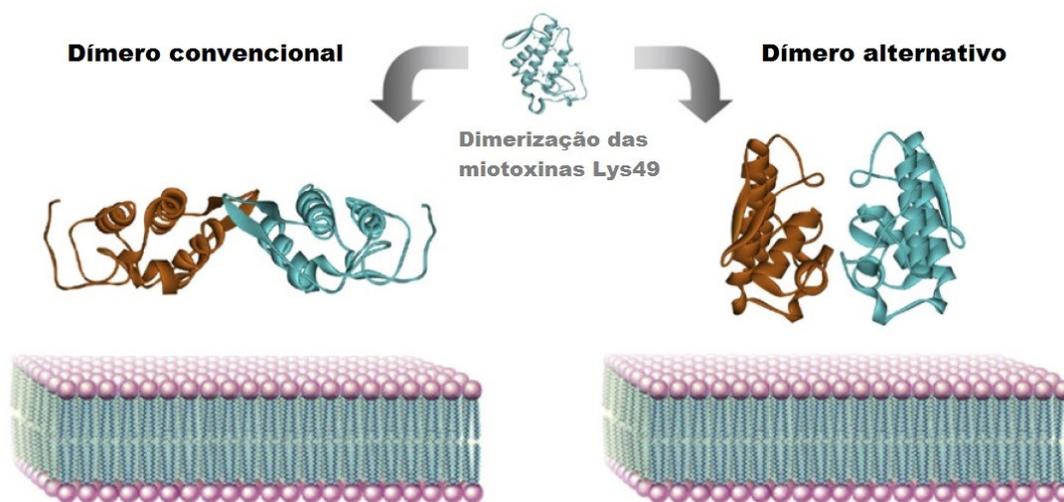


Figura 8: Representação dos dois tipos de dímeros de PLA₂. Adaptado de: LOMONTE e RANGEL, 2012.

Um mecanismo de ação abrangente para PLA₂s-Lys49 foi proposto em uma revisão de Fernandes et al. (2014), onde os autores relataram a presença de duas

regiões conservadas na maioria PLA₂s-Lys49: o domínio catiônico de ancoragem na membrana plasmática (MDoS), formado pelos resíduos C-terminais estritamente conservados (Lys115 e Arg118), eventualmente auxiliado por outros resíduos catiônicos expostos tais como Lys20, Lys80, Lys122 e Lys127; e o domínio hidrofóbico de desestabilização da membrana (MDiS), formado por resíduos de Leu e Phe. Este mecanismo envolve uma mudança oligomérica da proteína na presença de um ligante no canal hidrofóbico, que induz o alinhamento do MDoS e MDiS de ambos os monômeros e aumenta a eficácia deste processo de ancoragem (DOS SANTOS et al., 2009) e ruptura da membrana (KYTE e DOOLITTLE, 1982; WIMLEY e WHITE, 1996; FERNANDES et al., 2013), fazendo assim com que a enzima passe do estado “inativo” para o “ativo”, assumindo assim a conformação do dímero alternativo.

A BnSP-7 foi a primeira fosfolipase A₂ isolada da peçonha de *B. pauloensis* (SOARES et al., 2000). Essa toxina é cataliticamente inativa (Lys-49), com massa molecular de cerca de 14 kDa, e ponto isoelétrico de 8,8. BnSP-7 também é dimérica e a sua estrutura é essencialmente idêntica a estruturas de outras PLA₂s-Lys49, apresentando sete pontes de dissulfeto, aminoácidos compostos por resíduos básicos e hidrofóbicos, N-terminal composto por um resíduo de serina e resíduos de Gly30, Gly33, His48, Asp 99 conservados em sua estrutura (RODRIGUES et al., 1998; SOARES et al., 2000; MAGRO et al., 2003) (Figura 9). Com relação a suas propriedades farmacológicas, esta enzima induz necrose de fibras musculares, edema, libera creatina quinase do músculo gastrocnêmico de camundongos e apresenta atividade bactericida sobre *Escherichia coli* (RODRIGUES et al., 1998; SOARES et al., 2000; MAGRO et al., 2003) antiparasitária contra *Leishmania amazonensis* (NUNES et al., 2013) e *Toxoplasma gondii* (BORGES et al., 2016), dentre outras atividades (RODRIGUES et al., 2015).

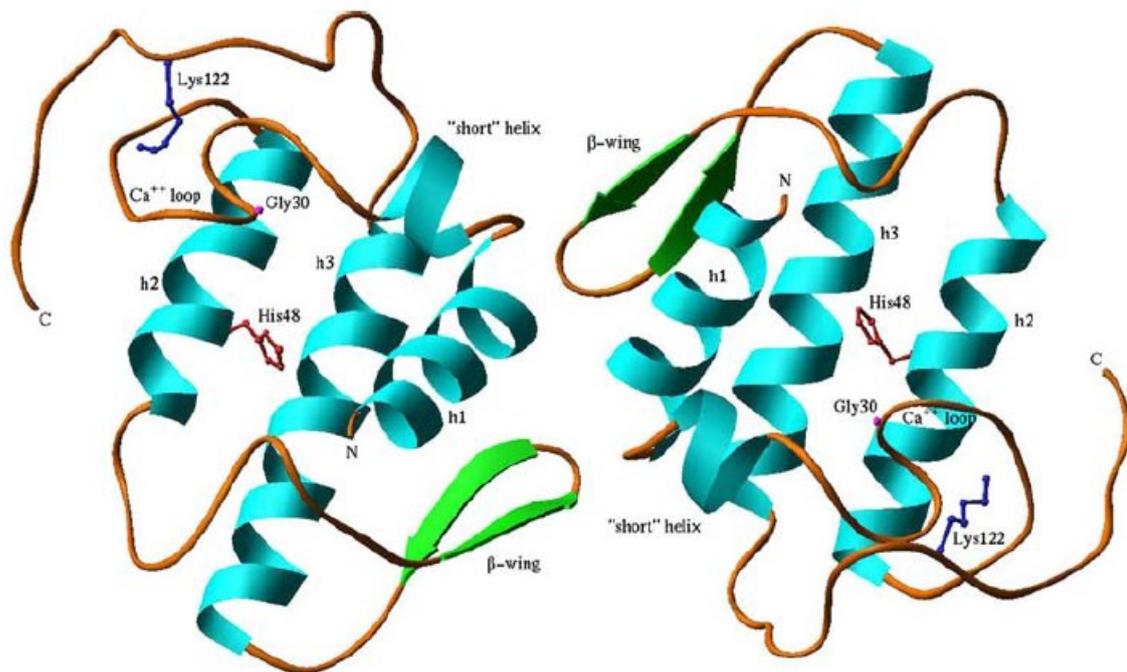


Figura 9: Diagrama de fita demonstrando a estrutura de BnSP-7. Fonte: Magro et al., 2003

A região C-terminal, inclui um segmento contendo os resíduos 115-129 das PLA₂s Lys49, a qual é conservada na maioria das enzimas dessa classe, apresentando aminoácidos catiônicos e hidrofóbicos responsáveis por causar danos as membranas celulares. Os resíduos catiônicos podem interagir eletrostaticamente com grupos aniônicos em um local de fosfolipídios da membrana, possivelmente carregado negativamente (LOMONTE et al., 2003; FERNADES et. al., 2013), enquanto que os resíduos hidrofóbicos, especialmente os aromáticos, podem interagir e possivelmente penetrar na bicamada fosfolipídica, resultando na sua desestabilização (NÚÑEZ et al., 2001). Esta ação está diretamente ligada com a forma dimérica das PLA₂-Lys49 em solução (FRANCIS et al., 1991; DA SILVA GIOTTO et al., 1998; OLIVEIRA et al., 2001).

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

1.6 – Ação de Fosfolipases associadas à patogênese:

Além de seus papéis fisiológicos, notoriamente implicados no processo inflamatório, as fosfolipases têm sido objeto de estudo em relação ao seu potencial patológico, avanços biotecnológicos e significado industrial (RAMRAKHIANI e CHAND, 2011). Dentre o potencial patológico, elas estão associadas a doenças como aterosclerose, (KARABINA et al., 2010; ROSENSON e HURT-CAMEJO, 2012; QUACH et al., 2014) diabetes, (BONE et al., 2015; STEFANO et al., 2019) e câncer (BRGLEZ et al., 2014; HALPERN et al., 2019).

Com a mesma relevância, o papel das PLs tem sido correlacionado através, de diferentes mecanismos patogênicos, associados na virulência de microrganismos (fungos e bactérias) e na maior infectividade e sobrevivência por parasitas de diferentes famílias (FLIEGER et al., 2001; POLLOK et al., 2003; BHANOT et al., 2005; ISTIVAN e COLOE, 2006; BURDA et al., 2015). Os patógenos microbianos usam várias estratégias para invadir a célula hospedeira e causar infecção, e dentre as mais simples delas, é a penetração e danos na parede celular externa em células hospedeiras. É provável que as fosfolipases estejam envolvidas nos processos de ruptura da membrana, com consequente destruição de fosfolipídios, que ocorrem durante o processo de invasão (RAMRAKHIANI e CHAND, 2011).

Alguns estudos relatam o envolvimento das fosfolipases como fatores de virulência em fungos oportunistas como *Candida albicans*, *C. glabrata*, *Cryptococcus neoformans* e *Aspergillus fumigatus* (BIRCH et al., 2004). Deste modo, foram avaliadas como potenciais alvos antifúngicos (NEELY e GHANNOUM, 2000; DJORDJEVIC, 2010; GHANNOUM, 2000; CHEN et al., 1997; CHEN et al., 2000). Evidências de diferentes classes de PLs também são relatadas em várias bactérias como, *Escherichia coli*, *Yersinia* spp, *Helicobacter pylori*, *Neisseria* spp, *Legionella* spp. e *Campylobacter* spp., *Rickettsia rickettsia*; *Clostridium perfringens*; e tem sido associada à patogênese causando diferentes síndromes de doença (OKABE et al., 1989; BAINE et al., 1988; FLIEGER et al., 2000; FLIEGER et al., 2001; NILIUS e MALFERTHEINER, 1996; SCHMIEL et al., 1998; MAURY et al., 2002).

No entanto, o mecanismo exato da ação das PLAs não foi definitivamente determinado (SNIJDER e DIJKSTRA, 2000; BOS et al., 2005; SCHMIEL et al., 1998; DORRELL et al., 1999; BANERJI et al., 2008; GRANT et al., 1997). Sua toxicidade tem sido associada à atividade citolítica resultante do acúmulo de produtos desestabilizadores da membrana ou pela extensa destruição dos fosfolípidios da membrana (ISTIVAN e COLOE, 2006).

Além da importância na patogênese em bactérias e fungos, a atividade fosfolipásica está correlacionada com a virulência, sobrevivência e remodelamento/modificação da composição de fosfolípidios de células hospedeiras por diferentes parasitas. Uma revisão feita por Belaunzarán e colaboradores (2011) considera os papéis importantes e variados que as PLs possuem, em tripanossomatídeos em relação às características bioquímicas, biológicas e moleculares e sua contribuição para a patogênese. Dentre as principais classes de PLs, é destacado a importância das PLA₁ e PLA₂. A presença e atividade de PLA₁ tem sido associada a estágios patogênicos especialmente em parasitas do gênero *Tripanossoma spp.* (OPPERDOES e ROY, 1982; WAINSELBAUM et al., 2001; APARICIO et al., 2004; GRUPPI et al., 1997; VILLALTA et al., 1998).

Já as PLA₂ (cada um dos seis tipos) estão implicadas em diversos mecanismos do metabolismo lipídico e progressão de doença. Nos parasitas protozoários especificamente, a família de enzimas PLA₂ tem sido implicada na invasão, remodelação da membrana, virulência e progressão da doença (WILSON e KNOLL, 2018). Em *Toxoplasma gondii* foi descrito que a inibição da PLA₂ protegia as células monocíticas humanas da invasão do parasita (GOMEZ-MARÍN et al., 2002); bem como é capaz de secretar uma PLA₂ independente de Ca²⁺ que está envolvida na penetração das células hospedeiras, facilitando a fusão de membranas durante a invasão e a síntese de produtos de eicosanóides de LOX e COX (SAFFER et al., 1989; SAFFER e SCHWARTZMAN, 1991; THARDIN et al., 1993). Recentemente, foi demonstrado que a fosfolipase TgPL₂ é importante para manter os níveis de ácidos graxos gerados por parasitas da família dos apicomplexas e regular os níveis de PC e LPC no parasita (LÉVÊQUE et al., 2017)

Relatos sobre o papel de PLA₂s em espécies de Leishmania também são descritos (BELAUNZARÁN et al., 2010; BELAUNZARÁN et al., 2011). Estudos mostraram a atividade da PLA₂ em sobrenadantes de cultura de promastigotas de

L. (L.) amazonensis e sugeriram que essa enzima pode ser um fator de progressão para a leishmaniose cutânea (PASSERO et al., 2008). Também foram descritas modificações composicionais nos fosfolipídios da membrana de macrófagos infectados. Os autores sugerem que esse efeito pode ser indiretamente refletido pela ação de uma PLA₂ endógena do parasita (HENRIQUES et al., 2003). Em *L. major*, uma PLA₂ é responsável pela hidrólise do fator de ativação de plaquetas e contribui para a virulência *in vivo* (PAWLOWIC e ZHANG, 2012).

Esses dados em conjunto sugerem que as PLA₂s possam servir como alvos terapêuticos para o tratamento dessas doenças (MURAKAMI et al., 2011; DENNIS et al., 2011; BONE et al., 2015; KARABINA et al., 2010). Por conseguinte, o uso de inibidores de PLs e da biossíntese lipídica ganhou grande interesse nos últimos anos para combater a infecção parasitária (LUX et al., 2000; LIRA et al., 2001; CROFT et al., 2003; URBINA, 2010; NOLAN et al., 2017). Estudos que busquem demonstrar o papel de moléculas capazes de inibir os efeitos patogênicos causados pelas fosfolipases endógenas de parasitas se mostram promissores.

No entanto, o conhecimento sobre estas enzimas está longe de ser completo e mais estudos são necessários para obter uma compreensão completa do mecanismo molecular em que essas enzimas participam (BELAUNZARÁN et al., 2010). Uma vez que poucos estudos demonstraram o isolamento e caracterizações bioquímicas, biológicas e estruturais de PLAs de parasitas, fontes alternativas de PLAs bem caracterizadas e facilmente isoladas são necessárias. Nesse sentido, estudos baseados em um transcriptoma de glândula e proteoma da peçonha de *Bothrops pauloensis* (RODRIGUES et al., 2012; RODRIGUES et al., 2015) revelam uma quantidade relevante de PLA₂s, que representam 31,9% da peçonha. Devido às sequências de aminoácidos da PLA₂ secretora de células eucarióticas e procarióticas serem altamente conservadas (SAFFER et al., 1989), as PLA₂s de peçonhas de serpentes podem ser usadas como modelos para o desenvolvimento de anticorpos capazes de reconhecer e inibir as PLAs de parasitas.

1.7 - Imunoglobulina Y:

As imunoglobulinas (Ig) são glicoproteínas chamadas anticorpos, que são secretadas pelas células plasmáticas em resposta a exposições antigênicas e são

consideradas um produto que afeta principalmente a imunidade humoral (ABBAS et al., 2010; AMRO et al., 2018).

Os anticorpos apresentam em sua estrutura básica duas cadeias leves e duas cadeias pesadas idênticas (ABBAS et al., 2010; KINDT et al., 2007). E em cada cadeia são encontradas duas regiões distintas: uma sequência variável na região N-terminal e uma sequência constante na região C-terminal. As interações entre essas cadeias ocorrem por interações covalentes (pontes dissulfetos) ou não covalentes que auxiliam na formação de domínios das imunoglobulinas, que constituem as diferentes regiões dos anticorpos, Fab (do inglês, *Fragment antigen binding* – fragmentos de ligação ao antígeno) e Fc (*Fragment, Crystallizable* – Fragmento cristalizável) ambas ligadas por uma região flexível (região de dobradiça) (ABBAS et al., 2010).

A imunoglobulina Y (IgY) foi nomeada pela primeira vez quando Leslie e Clem (1969) enfatizou as distintas diferenças entre IgY e IgG, tais como como diferenças antigênicas e o tamanho maior da cadeia pesada de IgY, sugerindo o uso desse termo em vez de IgG (LESLIE e CLEM, 1969; SCHADE et al., 2005; CHALGHOUMI et al., 2009). Essa ideia não foi aceita imediatamente, com grande parte da literatura ainda se referindo à IgY como IgG de galinha, devido às suas semelhanças funcionais (ZHANG et al., 2017). A imunoglobulina é chamada de IgY porque está presente na gema do ovo (IgY, Y = *yolk*, gema em inglês). As galinhas também produzem anticorpos das classes IgM e IgA, ambos presentes na clara do ovo.

IgY está presente em aves, répteis, anfíbios e peixes pulmonados e é o precursor evolutivo de IgG e IgE, presente apenas em mamíferos (WARR et al., 1995). Com o intuito de conferir proteção materna ao descendente, os anticorpos IgY circulantes no sangue da galinha, ao passarem pelo ovário, são transportados ativamente através do epitélio do folículo ovariano para a gema, em quantidades proporcionais às detectadas no soro da galinha, alcançando valores médios entre 20-25 mg/mL de gema pura (DAVISON et al., 2008; SUNNWO, 2015).

Em geral, a gema dos ovos transporta quantidades elevadas de anticorpos IgY. Estima-se que o IgY específico produzido em galinhas é cerca de 1 a 10% da quantidade total de anticorpos (MICHAEL et al., 2010). No entanto, a quantidade de anticorpos produzidos correlaciona-se com a quantidade de antígeno aplicado

à ave, sua imunogenicidade e peso molecular (POLSON et al., 1980; GRANDO et al., 2017).

Durante um período de 12 meses de postura, uma galinha produz em média 300 ovos. Desse total de ovos é possível extrair aproximadamente 40g de IgY policlonal total. Para se obter a mesma quantidade de IgG, utilizando coelhos, são necessários quatro animais (HATTA et al., 1993; XU et al., 2011)

IgY tem a arquitetura típica de anticorpos de duas cadeias leves (L), com 25 kDa e duas pesadas (H), cada uma com massa molecular de 67 a 70 kDa. As cadeias leves possuem uma região constante (CL) e uma região variável (VL), semelhante à IgG. A principal diferença entre IgY e IgG é encontrada nas cadeias pesadas. A IgG possui três regiões constantes nas cadeias pesadas (CH1, CH2 e CH3), enquanto a IgY a cadeia pesada epsilon (ϵ) possui um domínio variável e quatro domínios constantes (Cu1; Cu2; Cu3 e Cu4) (KOVACS-NOLAN e MINE, 2012). A estrutura do fragmento ligante de antígeno (Fab) da IgY, semelhante ao IgG, possui uma cadeia leve completa com seu domínio variável e o domínio pesado, associados aos domínios variável e o Cu1 da cadeia pesada, enquanto o fragmento cristalizável (Fc) da IgY é composto pelos três domínios constantes restantes na cadeia pesada (Cu2, Cu3 e Cu4) (SCHADE, 2005). Um outro domínio constante, com as cadeias de carboidratos correspondentes, dá a IgY uma massa molecular mais alta (180 kDa) em comparação com IgG (150 kDa) (MICHAEL et al., 2010) (Figura 10).

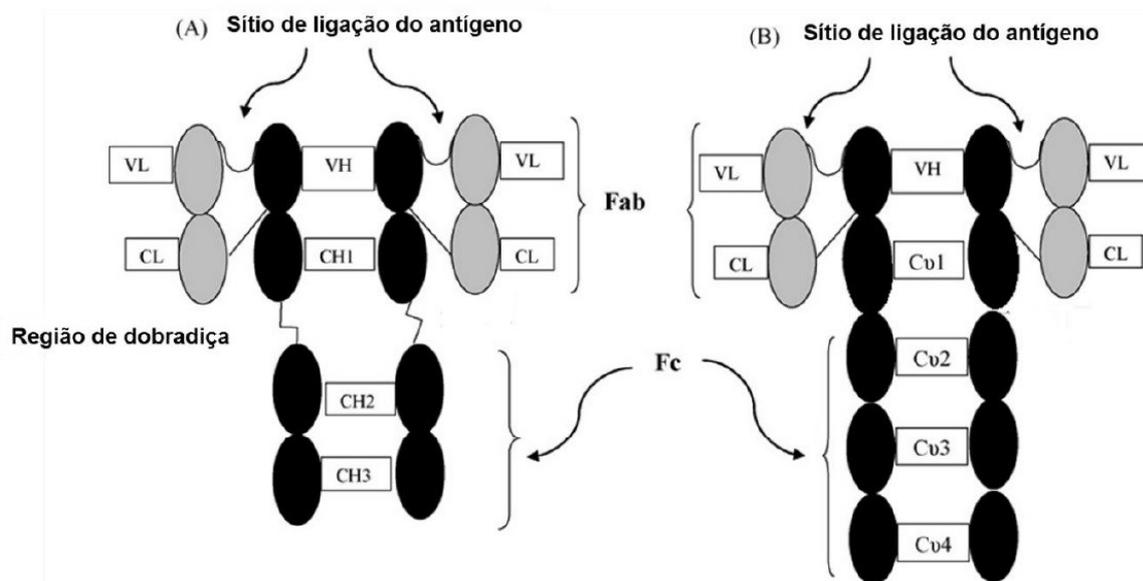


Figura 10: Estrutura das imunoglobulinas. **A:** IgG de mamífero: VH, domínio variável da cadeia pesada; VL, domínio variável da cadeia leve; CL, domínio constante da cadeia leve; CH1, CH2 e CH3, domínios constantes da cadeia pesada. **B:** IgY de aves: VH, domínio variável da cadeia pesada; VL, domínio variável da cadeia leve; CL, domínio constante da cadeia leve; Cu1, Cu2, Cu3 e Cu4, domínios constantes da cadeia pesada.

Devido à sua capacidade de se ligar a alvos específicos, os anticorpos IgY desempenham papéis críticos em ensaios de diagnóstico e terapia (AMRO et al., 2018). A maioria dos anticorpos atualmente disponíveis é produzida em mamíferos, especialmente em pequenos roedores (MICHAEL et al., 2010). No entanto, a produção de anticorpos em mamíferos pode ser desafiadora devido ao fato de que alguns antígenos provocam respostas imunes fracas ou são não imunogênicas. Além disso, a produção de anticorpos em mamíferos envolve procedimentos que causam dor e sofrimento aos animais; como imunização, coleta de amostras de sangue e sacrifício (NARAT, 2003). A busca por técnicas mais eficientes e econômicas, bem como pela redução e refinamento do uso de animais, levou ao crescente interesse pelos anticorpos da gema de ovo (IgY) (PEREIRA et al., 2019).

As vantagens do IgY resultam de suas características únicas: (1) são produzidos em gema de ovo; então não há necessidade de sangrar animais, (2) quantidades consideráveis de anticorpos podem ser obtidas a um custo razoavelmente baixo, (3) geralmente rápido processo de produção; (4) é possível

produzir um anticorpo específico para pequenas quantidades de antígeno que é pouco imunogênico em mamíferos; (5) pode ser gerado através de processos de produção convenientes que o tornam um anticorpo atraente para pesquisa e diagnóstico; (6) IgY pode ser armazenada em ovos a 4°C por pelo menos um ano; (7) não ativam o sistema complemento dos mamíferos, não se ligam aos receptores Fc encontrados no sistema circulatório (ROSE et al., 1974; LARSSON et al., 1991; CALZADO et al., 2003; BIRD et al., 2009; HODEK et al., 2013; LESNIEROWSKI e STANGIERSKI, 2018).

Portanto, a produção de anticorpos policlonais através da imunização em galinhas torna a IgY uma excelente alternativa, produzindo os anticorpos em grande quantidade e qualidade a partir de métodos simples de produção, sem a necessidade de técnicas invasivas (AMRO et al., 2018).

Vários tipos de antígenos têm sido usados para produzir IgY específica em aves, como antígenos complexos (vírus, bactérias e parasitas) e antígenos únicos (proteínas, polissacarídeos, peptídeos e ácidos nucleicos) (CHALGHOUMI et al., 2009). Diferentes concentrações de antígeno também podem ser combinadas com adjuvante. Entretanto, é comum o uso de 10 a 100 µg de antígeno por mL injetado em dois ou três locais, com a idade da galinha variando entre sete e oito semanas (MICHAEL et al., 2010).

Sendo uma técnica produtiva, bem como mais refinada do ponto de vista do bem-estar animal, a tecnologia IgY tem sido aplicada com sucesso em fins científicos na saúde humana e veterinária, como em imunodiagnóstico, neutralização de toxinas de animais peçonhentos, imunoterapia, atividade bactericida e ensaios anti-parasitários (HORIE et al., 2004; CAI et al., 2012; MENDOZA et al., 2012; RAHMAN et al., 2013; SAMPAIO et al., 2014; SUNNWO, 2015; GRANDO et al., 2017).

IgY anti-PLA₂s de peçonhas de serpentes demonstram ser moléculas promissoras para aplicação biotecnológica e terapêutica, em especial, na redução de efeitos antiparasitários. Além disso, podem ser utilizadas como ferramenta na busca de possíveis alvos para se desvendar o mecanismo de ação de doenças e causas de morte em parasitas, servindo como um modelo de estudo para ação de outras drogas.

A imobilização de anticorpos em eletrodos pode gerar um sensor químico capaz de detectar antígenos específicos com alta seletividade. Um sensor químico é definido como um dispositivo que transforma a informação química em um sinal analítico. Os biossensores podem ser definidos como dispositivos que convertem um sinal bioquímico em um sinal mensurável, constituídos de um material biológico como elemento de reconhecimento (THEVENOT et al., 2001; GRIFFIN e STRATIS-CULLUM, 2009).

Os biossensores são constituídos por três componentes principais, o elemento de reconhecimento biológico, o qual identifica o alvo; o transdutor, que converte este reconhecimento em um sinal mensurável e o sistema de processamento de sinal, que envolve a amplificação e exibição dos dados em um formato apropriado (PERUMAL e HASHIM, 2014) (Figura 11).

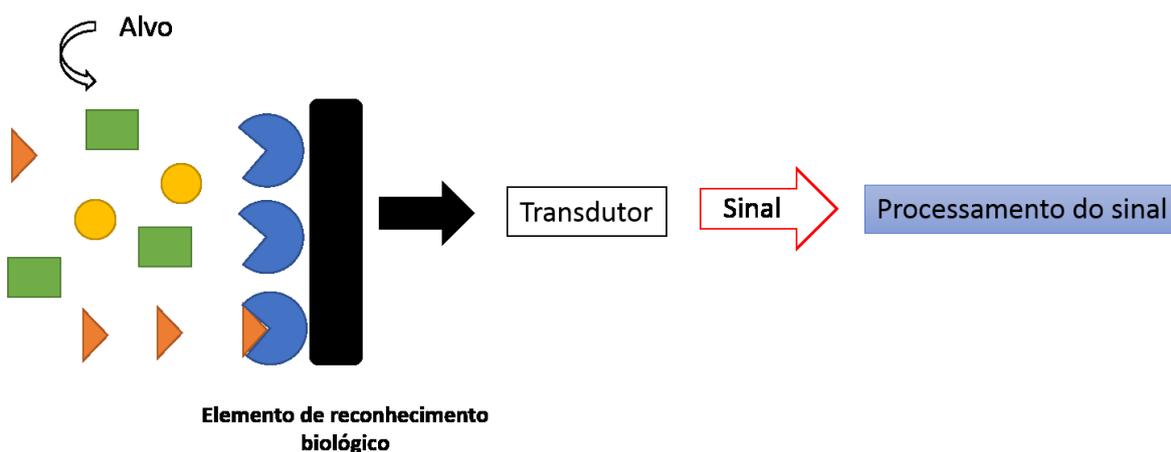


Figura 11: Representação esquemática de um biossensor.

Os biossensores podem ser classificados de acordo com o princípio de transdução do sinal, tais como, eletroquímicos, piezoelétricos, calorimétricos e ópticos. Os biossensores eletroquímicos são baseados no consumo e/ou geração de espécies eletroativas durante uma interação química e biológica (MEHRVAR e ABDI, 2004), nesse processo o transdutor mensura o sinal eletroquímico produzido por essa interação. Os biossensores eletroquímicos são os mais comuns e estudados para o uso em análises clínicas (SONG et al., 2006).

Uma variedade de biomoléculas são comumente utilizadas como elemento de reconhecimento biológico para a construção de biossensores, tais como,

enzimas, anticorpos, ácidos nucleicos, cada um com suas próprias vantagens na detecção do analito alvo (SILVA et al., 2009; HENNESSEY et al., 2009; BATRA et al., 2014). Baseando-se no elemento de reconhecimento biológico, o biossensores ao serem imobilizados com um anticorpo são classificados como imunossensores.

Os imunossensores tem desempenhado um papel importante na melhoria da saúde pública, por proporcionar aplicações para uma detecção rápida, sensível e específica, em áreas como a química clínica, qualidade dos alimentos, monitoramento ambiental e diagnóstico (RAMÍREZ et al., 2009). Além disso são dispositivos de detecção rápidos e de fácil manuseio, portáteis e não necessitam de mão de obra especializada para operação (TANISELASS et al., 2019; LEE et al., 2019; CORDEIRO et al., 2019). Deste modo, a imobilização de anticorpos anti-PLA em sensores químicos representam relevância científica uma vez que a detecção de PLA em extratos parasitários podem auxiliar na investigação de um diagnóstico precoce.

Esses estudos e a grande variedade de efeitos patogênicos atribuídos às PLA₂s nos levou a pesquisar as propriedades anti-parasitária de anticorpos IgY anti-BnSP-7, com o objetivo de revelar novos efeitos moleculares específicos e/ou alvos metabólicos compatíveis com perspectivas de futuro na terapia.

2.0 – Objetivos gerais

O presente trabalho teve como objetivo geral produzir anticorpos policlonais anti-fosfolipase A₂ (BnSP-7, isolada da peçonha bruta de *Bothrops pauloensis*) em galinhas da raça *Gallus gallus domesticus* e avaliar seu potencial no reconhecimento de diferentes fosfolipases A₂ isoladas; na neutralização da atividade citotóxica da BnSP-7; em atividades antiparasitárias e construção de um bioeletrodo.

2.1 – Objetivos específicos

- Produzir anticorpos (policlonais) específicos para a fosfolipase A₂ BnSP-7 através da indução imunogênica em galinhas da raça *Gallus gallus domesticus*;

- Purificar os anticorpos (policlonais IgY) anti-BnSP-7;
- Avaliar a imunorreatividade desses anticorpos frente diferentes fosfolipases A₂ isoladas da peçonha de *Bothrops pauloensis* e *Bothrops jararacussu* por meio de ensaios de ELISA.
- Avaliar o reconhecimento conformacional de anticorpos policlonais anti-fosfolipase A₂ (BnSP-7) sobre a BnSP-7 por meio de ensaios de ELISA.
- Verificar o potencial neutralizador de anticorpos policlonais anti-fosfolipase A₂ (BnSP-7) sobre atividade citotóxica da BnSP-7 em células C2C12;
- Avaliar a imunorreatividade de anticorpos policlonais anti-fosfolipase frente a extratos de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e *Toxoplasma gondii* por meio de ensaios de ELISA;
- Avaliar a imfluorescência de anticorpos policlonais anti-fosfolipase A₂ frente a extratos de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e *Toxoplasma gondii*;
- Avaliar os efeitos citotóxicos e anti-proliferativos de anticorpos policlonais anti-fosfolipase A₂ em *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e *Toxoplasma gondii* pelo ensaio de MTT, curva de crescimento, β -galactosidase;
- Avaliar os efeitos anti-invasivo de anticorpos policlonais anti-fosfolipase A₂ em *Leishmania (Leishmania) amazonensis*;

- Construir um bioeletrodo baseado em um eletrodo de grafite modificado com um nanocompósito e anticorpos imobilizados para a detecção de uma fosfolipase A₂.

3.0 – Materiais e métodos

3.1. Toxinas de peçonha de serpentes

As peçonhas de *Bothrops pauloensis* e *Bothrops jararacussu* foram coletadas de serpentes mantidas no Centro de Extração de Toxinas Animais Ltda - Morungaba, SP, Brasil. O registro deste serpentário foi aprovado pelo órgão governamental IBAMA (Instituto Brasileiro do Meio Ambiente) e reconhecido pelo uso de recursos naturais renováveis (2087163). Todas as toxinas (BnSP-7, BnSP-6, BthTX-I, BthTX-II, BpPLA₂-TXI, BpMP-I) utilizadas neste trabalho foram obtidas do Banco de Toxinas (isoladas de acordo com métodos previamente padronizados pelo nosso grupo de pesquisa segundo HOMSI-BRANDEBURGO et al., 1988; RODRIGUES et al., 1998; NAVES DE SOUZA et al., 2012; FERREIRA et al., 2013) do Laboratório de Bioquímica e Toxinas animais do Instituto de Biotecnologia da Universidade Federal de Uberlândia.

3.2. Produção dos anticorpos policlonais

3.2.1. Imunização de galinhas

Todos os procedimentos utilizando animais experimentais (galinhas, *Gallus gallus domesticus* e BALB/C) foram realizados após aprovação da Comissão de Ética em Uso de Animais (CEUA) - Universidade Federal de Uberlândia (n ° 063/08, nº130/15).

Galinhas poedeiras (*Gallus gallus domesticus*, linhagem Isa Brown) foram utilizadas para protocolos de imunização para induzir a produção de anticorpos policlonais. As imunizações foram realizadas em dois grupos: um com BnSP-7 e o outro com PBS, 100 mM, pH 7,2 (grupo de controle). As galinhas (duas galinhas em cada grupo) foram imunizadas cinco vezes, em intervalos de 14 dias, com 0,25

mg de BnSP-7. Para a primeira imunização, as amostras contendo a toxina BnSP7 foram dissolvidas em 250 μ L de PBS e um volume igual de adjuvante completo de Freund (Sigma-Aldrich Co., EUA). As imunizações seguintes foram realizadas com os mesmos antígenos e adjuvante incompleto de Freund (Sigma-Aldrich Co., EUA) (SCHWARZKOPF et al., 2001). As aplicações foram realizadas por via intramuscular, no músculo peitoral em diferentes pontos. Amostras de sangue foram coletadas em intervalos de 14 dias alternados com imunizações. Os ovos foram coletados semanalmente e armazenados a 4°C até posterior processamento.

3.2.2. Preparação de extrato de proteína de gema e isolamento de IgYs.

As coletas de ovos iniciaram uma semana antes da primeira imunização e se estenderam por mais 11 semanas. IgY de alta pureza foram preparados como descrito anteriormente (AKITA et al., 1993). As gemas de ovo foram diluídas 15 vezes em água deionizada, e o pH da solução foi ajustado para 5,5 com tampão acetato 600 mM pH 4,8. As amostras foram homogeneizadas durante a noite a 4°C. As soluções ricas em IgY foram centrifugadas a 800 x g durante 40 min a 4°C; o *pellet* rico em lipídeos, chamado de P1 foi armazenado para análise posterior em SDS-PAGE 12,5% (v/v) Laemmli (1970) e o sobrenadante isento de lípidos (S1) foi recolhido e ajustado para pH 7,4 com 100 mM de hidróxido de sódio (NaOH). S1 foi então precipitado com a adição de 20% de sulfato de amônio (Sigma-Aldrich Co., EUA). Após centrifugação (2000xg, 25 min, 4°C), o sedimento enriquecido com IgY (P2) foi recuperado e ressuspenso em PBS (1:10 volume inicial). Uma alíquota do sobrenadante (S2) foi retirada para análise posterior em SDS-PAGE a 12,5% (v/v) e em seguida, foi descartado. As amostras P2 foram fracionadas numa coluna HiTrap IgY HP previamente equilibrada com o mesmo tampão. Os anticorpos IgY foram eluídos utilizando um gradiente linear de tampão fosfato de sódio 200 mM, pH 7,5, com fluxo de 0,5 mL / min no sistema ÄKTA prime plus (Amersham Biosciences). As frações eluídas foram dialisadas com água ultrapura para eliminar o sal residual; a concentração da proteína foi determinada a 280nm (BioDrop, UK), liofilizada e mantida a -20°C até utilização. O perfil proteico foi analisado em SDS-PAGE a 12,5% (v/v).

3.3. Resposta específica ao antígeno durante o curso da imunização

A produção de anticorpos IgY antígeno-específicos pelas galinhas durante o tempo de imunização foi examinada por ELISA. Paralelamente à detecção de IgY nas gemas, foi avaliada a soro-conversão de anticorpos específicos IgY produzidos pelas galinhas imunizadas.

Microplacas de 96 poços de poliestireno de baixa afinidade (Greiner Bio-One, Kremsmünster, Áustria) foram revestidas com BnSP-7 (10 µg/mL) em tampão carbonato-bicarbonato (0,06 M, pH 9,6) e incubadas durante a noite a 4°C. Depois de lavar os poços cinco vezes com PBS contendo Tween 20 a 0,05% (v/v) (PBS-T), adicionou-se leite em pó sem gordura (50 µL / poço) em PBS-T (1% PBS-T-M) como solução de bloqueio. A placa foi incubada durante 1 h a 37 e lavada cinco vezes com PBS-T. Amostras de anti-BnSP-7 IgY (1:50) e amostras de soro de galinhas (1:200) foram diluídas em PBS-T-M a 1%, adicionadas e incubadas por 1 h a 37°C. Após 5 lavagens com PBS-T, o anticorpo secundário *anti-chicken* IgY, produzido em coelho conjugado com peroxidase (Sigma-Aldrich Co., EUA), foi diluído 1: 15.000 em 1% PBS-TM, adicionado e incubado por 1 h em 37°C. Após lavagem 5 vezes, a reação foi desenvolvida pela adição de O-fenilenodiamina (Sigma-Aldrich Co., EUA) com 0,03% (v/v) de peróxido de hidrogênio (Merck, Brasil) diluído em 0,1 M de tampão fosfato de citrato (pH 5,5), por 15 min. A reação foi interrompida pela adição de 25 µL de H₂SO₄ 1M (Vetec, Brasil). A densidade óptica (DO) foi determinada a 492 nm numa leitora de placa (Multiskan GO, Thermo Scientific).

Os dados foram expressos como índice ELISA (EI): $EI = DO / cutoff$ dos controles negativos mais três desvios padrão. Para estabelecer os valores de corte para os controles negativos de gema de ovo, utilizou-se a OD das primeiras seis semanas das galinhas do grupo controle (imunizadas com PBS), enquanto para estabelecer as do soro, a OD das primeiras cinco semanas do grupo controle (imunizado com PBS) foi utilizada. Valores de EI > 1.2 foram considerados positivos.

3.4. Teste de avidéz

A maturação da avidéz dos anticorpos IgY foi examinada por ELISA como descrito no item 3.4, mas com a adição de 6 M de ureia (Synth, Brasil) em PBS-T após incubação com amostras de anti-BnSP-7 IgY. A reação foi revelada, interrompida e medida conforme descrito para o ELISA indireto regular. Os resultados de avidéz foram expressos como índice de avidéz (IA), calculado como a razão entre a OD obtida dos poços tratados com ureia (U+) e aqueles sem uréia (U-) de acordo com a fórmula: $AI\% = OD\ U\ + / OD\ U\ - \times 100$.

3.5 – Análise de reconhecimento conformacional por ELISA

A análise do reconhecimento conformacional dos anticorpos IgY sobre a proteína alvo BnSP-7 foi avaliada pelo teste de ELISA, como descrito no item 3.3, porem o teste foi realizado com a BnSP-7 em sua estrutura nativa e BnSP-7 desnaturada (100°C por 10min, 5% β-mercaptoetanol e 2% SDS). A reação foi revelada, interrompida e medida conforme descrito para o ELISA indireto regular.

Para determinar o cálculo de corte e o índice ELISA (IE), foi utilizada uma amostra irrelevante (PBS). O valor de corte foi obtido pelos valores médios da densidade óptica (DO) do PBS mais três desvios-padrão. Valores de IE > 1,2 foram considerados positivos. Quatro experimentos independentes foram realizados em triplicata.

3.6. Reatividade cruzada pelo ensaio de ELISA

A reatividade cruzada contra diferentes toxinas previamente isoladas da peçonha de *B. pauloensis* e *B. jararacussu* também foi verificada. Microplacas de 96 poços de poliestireno de baixa afinidade (Greiner Bio-One, Kremsmünster, Áustria) foram revestidas com BnSP-7, BnSP-6, BthTX-I, BthTX-II, BpPLA₂TX-I ou BpMP-I (10 µg / mL). Após a lavagem, a solução de bloqueio foi adicionada e lavada cinco vezes com PBS-T; amostras fracionadas de anti-BnSP-7 IgY (2 µg/mL) foram diluídas em 1% de PBS-T-M, adicionadas e incubadas por 1 h a 37°C. As etapas a seguir foram executadas conforme descrito anteriormente.

Para determinar o cálculo de corte e o índice ELISA (IE), foi utilizada uma toxina irrelevante (BpMP-I). O valor de corte foi obtido pelos valores médios da densidade óptica (DO) de BpMP-I mais três desvios-padrão. Valores de IE > 1,2 foram considerados positivos. Quatro experimentos independentes foram realizados em triplicata.

3.7. Neutralização da atividade da PLA₂ por citotoxicidade em células C2C12

Mioblastos de camundongo (C2C12) foram cultivados em meio RPMI 1640 suplementado com 10% (v/v) de soro bovino fetal (FBS), 2 mM de L-glutamina, 2 mM de piruvato de sódio, 1 mM de aminoácidos não essenciais, 1% de penicilina (100 UI / mL), estreptomicina a 1% (100 mg / mL) e incubadas a 37°C sob 5% de CO₂. Mioblastos C2C12 foram cultivados a uma densidade inicial de aproximadamente 1 x 10³ células / poço em microplacas de 96 poços. Após atingir a confluência de aproximadamente 80%, o meio de crescimento foi substituído por meio de diferenciação, que consiste no mesmo meio descrito acima, mas suplementado com 1% de FBS, a fim de obter a forma diferenciada dessas células (miotubos). As células foram utilizadas após 6 dias adicionais de cultura, quando foi observada uma vasta proporção de longos miotubos multinucleados.

Para o ensaio de citotoxicidade, as células C2C12 foram semeadas a 1 x 10⁴ células por poço em microplacas de 96 poços. Após 24 h, foi adicionado meio novo contendo BnSP-7 (50 µg / mL) ou BnSP-7 pré-incubada com anti-BnSP-7 IgY (µg / mL) por 1 h nas proporções de 1:1; 1:2,5; 1:5 (BnSP-7: anti-BnSP-7 IgY, m / m). As células controle foram incubadas com PBS ou anti-BnSP-7 IgY (250 µg). Após 24 h, as células foram incubadas com 5 mg / mL de MTT (brometo de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difenil tetrazólio) durante 3 h a 37°C. Os cristais de formazan resultantes da redução de MTT foram dissolvidos pela adição de 100 µL de PBS contendo 10% de SDS e 0,01 M de HCl. Após 18 h, a absorbância foi lida em uma leitora de placa (Multiskan GO, Thermo Scientific) a 570 nm. Três experimentos independentes foram realizados em triplicata.

3.8. Cultura de parasitos

A cepa de *Toxoplasma gondii* RH foi cultivada em células HeLa com meio RPMI 1640 suplementado com penicilina, estreptomicina e 2% de FBS a 37°C em 5% de CO₂ (BARBOSA et al., 2008). Estes taquizoitos foram utilizados para preparação de antígeno.

Leishmania (Leishmania) amazonensis (linhagem IFLA/BR/67/PH8), promastigotas, foram cultivadas em meio LIT, pH 7,4, suplementado com 10% de FBS, 1% de penicilina (100 UI / mL) e 1% de estreptomicina (100 mg / mL), 2% de glicose - LIT completo - a 23 ± 0,5 °C. Os promastigotas utilizados em todos os experimentos foram isolados da fase estacionária de crescimento e utilizados para preparo de antígenos.

3.9. Preparação de extratos de *T. gondii* e *L. (L.) amazonensis*

Taquizoítos e promastigotas de *T. gondii* e *L. (L.) amazonensis*, respectivamente, foram coletados e centrifugados a 4.000 g por 10 min. Os parasitas foram lavados em solução salina tamponada com fosfato (PBS, pH 7,2) duas vezes e ressuspensos em 1 mL de inibidor de protease (Complete Ultra Tablets, Roche) diluído em PBS. Seis ciclos de congelamento (nitrogênio líquido) e descongelamento (banho maria a 37°C) foram realizados para obtenção do extrato bruto. Alíquotas foram removidas do extrato bruto e centrifugadas a 3000g por 10min em uma centrífuga refrigerada (4°C). O pellet foi descartado e coletado o sobrenadante (extrato solúvel) e congelado a -20°C. Dosagem de proteína foi realizada pelo método de Bradford (1976).

3.10. Reconhecimento de alvos no extrato de *T. gondii* e *L. (L.) amazonensis* por anti-BnSP-7 IgY

Para avaliar o reconhecimento de possíveis alvos no extrato de *T. gondii* e *L. (L.) amazonensis*, microplacas de 96 poços de poliestireno de baixa afinidade (Greiner Bio-One, Kremsmünster, Áustria) foram recobertas com 10 µg / mL dos extratos brutos e solúveis dos parasitas correspondentes. Após a lavagem, as

placas foram bloqueadas com solução de bloqueio e lavadas cinco vezes com PBS-T. Amostras purificadas de anti-BnSP-7 IgY (30 µg / mL), anti-*T.gondii* IgY (1: 100) (controle positivo), IgY *anti-Leishmania* (1: 100) (controle positivo) e anticorpos IgY do grupo controle (30 µg / mL) (controle negativo), foram diluídos em PBS a 1% TM, adicionado e incubado durante 1h a 37°C. Os seguintes passos foram realizados pelo ensaio ELISA como descrito anteriormente.

Os dados foram expressos como índice ELISA (EI): $EI = DO / \text{cutoff}$ dos controles negativos mais três desvios padrão. Controles positivos foram gentilmente cedidos pelo Laboratório de Imunoparasitologia da Universidade Federal de Uberlândia. Para estabelecer os valores de corte, foi utilizado o DO das aves do grupo controle (imunizadas com PBS). Valores de IE > 1,2 foram considerados positivos.

3.11. Ensaio de imunofluorescência

Os anticorpos anti-BnSP-7 IgY purificados foram aplicados a taquizoítos e promastigotas de *T. gondii* e *L. (L.) amazonensis*, respectivamente, a fim de identificar a posição de possíveis alvos por imunofluorescência indireta. O *pellet* contendo taquizoítos e promastigotas obtidos após o repique celular foram incubados com 1 mL de formaldeído a 1% durante 30 min a 37°C e, em seguida, 10 mL desta solução foi colocada em lamínulas de vidro. Após a secagem dos poços à temperatura ambiente, as lamínulas de vidro foram analisadas sob um microscópio óptico (Nikon) para confirmar a fixação dos parasitas. Para a análise, foram utilizadas duas abordagens: Os parasitas fixos colocados em lamínulas de vidro foram permeabilizados em uma solução de PBS contendo 0,1% de Triton X-100 durante 30 min; e outra abordagem os parasitas fixos não foram permeabilizados. Subsequentemente, as lamínulas de vidro foram lavadas três vezes em PBS durante 5 min cada, sendo os seguintes passos aplicados a ambas as abordagens acima mencionadas.

Taquizoítos e promastigotas foram incubados com anti-BnSP-7 (30 µg), IgY dos grupos controle (30 µg) (controle negativo) e IgY anti-*T. gondii* ou *anti-Leishmania* (1: 100) (controles positivos) diluídos em PBS durante 30 min a 37°C e

depois lavados 3 vezes (5 min) com PBS. Em seguida, os parasitas foram incubados com anticorpo secundário produzido em coelho *anti-chicken* IgY conjugado com isotiocianato de fluoresceína (FITC, Sigma-Aldrich Co., EUA) (1:50) e contrastado com azul de Evans (1: 100) (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil) a 37 ° C durante 45 min. Após este tempo, uma lavagem final (5 min) foi realizada com PBS. Controles positivos foram gentilmente cedidos pelo Laboratório de Imunoparasitologia da Universidade Federal de Uberlândia. A reação foi lida usando um microscópio confocal LSM 510 (Meta, Carl Zeiss, Alemanha).

3.12. Ensaio de Citotoxicidade

3.12.1. Citotoxicidade em *L. (L.) amazonensis*

Ensaios de citotoxicidade na presença de anticorpos anti-BnSP-7 IgY foram realizados em formas promastigotas pelo ensaio MTT. Promastigotas (1×10^5) promastigotas/poço) foram colocadas em placas de cultura de 96 poços e incubadas a 23°C com diferentes concentrações de IgY anti-BnSP-7 (diluição seriada dupla de 100,0 µg / mL a 0,09 µg / mL) por 72 h. Os parasitas do controle negativo foram incubados com PBS. Após 72 h, os promastigotas foram incubados com 5 mg / mL de MTT (brometo de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difenil tetrazólio) durante 3 h a 37 °C. Os cristais de formazan foram dissolvidos pela adição de 100µL de PBS contendo 10% de SDS e 0,01 M de HCl e após 18 h, a absorbância foi medida em um espectrofotômetro de varredura de múltiplos poços (MultiskanGO, Thermo Scientific) a 570 nm. Três experimentos independentes foram realizados em quadruplicata.

O mesmo ensaio foi realizado para avaliar a citotoxicidade dos anticorpos IgY anti-BnSP-7 em macrófagos derivados da medula óssea (MDMO) conforme a metodologia descrita acima.

3.12.2. Citotoxicidade em taquizoítos de *T. gondii*

Os taquizoítos (1×10^5 / mL) foram tratados com anticorpos anti-BnSP-7 IgY (15 µg / mL, 12,5 µg / mL, 10,0 µg / mL e 5,0 µg / mL) por 3 horas e corados por

azul de tripan. Para os controles negativos, os taquizoítos (1×10^5 / mL) foram tratados com meio RPMI 1640. Parasitos inviáveis que apresentam um citoplasma escuro foram contados em um microscópio óptico (STROBER, 2001; CASTANHEIRA et al., 2015). Três experimentos independentes foram realizados em triplicata.

3.13. Ensaio anti-proliferativo

3.13.1. Ensaio anti-proliferativo em promastigostas de *L. (L.) amazonensis*

Com o objetivo de avaliar o efeito dos anticorpos anti-BnSP-7 na proliferação celular de promastigotas de *L. (L.) amazonensis*, parasitas (1×10^5 células.mL⁻¹) foram cultivados em frascos de cultura de 25 cm² e tratados ou não (controle) com 12,5 µg/mL e 10,0 µg/mL de anti-BnSP-7 IgY. Às 0, 24, 48, 72 e 96 h após a incubação com os anticorpos, os parasitas foram fixados usando 1% de paraformaldeído e contados em uma câmara de Neubauer para determinar as concentrações do parasita. Três experimentos independentes foram realizados em quadruplicata.

3.13.2. Ensaio anti-proliferativo em taquizoítos de *T. gondii*

Células HeLa foram cultivadas numa placa de cultura de 96 poços (2×10^4 células / 200µL / poço) em meio RPMI com 10% de FBS durante 24 h a 37°C sob 5% de CO₂. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e foi adicionado os taquizoítos RPMI (controle) ou *T. gondii* tratados previamente por 1 hora com anticorpos anti-BnSP-7 IgY (12,5 µg / mL e 10,0 µg / mL). Foram adicionados 1×10^5 parasitas / 200 µL / poço e incubados por 24 h.

As células foram submetidas à proliferação intracelular de *T. gondii* utilizando um ensaio colorimétrico de β-galactosidase como descrito anteriormente (TEO et al., 2007). Resumidamente, as células HeLa foram incubadas com 100 µl de tampão de lise (100 mM HEPES, 1 mM MgSO₄, 0,1% Triton X-100, 5 mM ditioneitol) durante 15 min. Posteriormente, os lisados foram misturados com 160 µL de tampão de ensaio (tampão fosfato 100 mM, pH 7,3, β-mercaptoetanol 102 mM, MgCl₂ 9 mM) e, posteriormente, com 40 µL de CPRG 6,25 mM. (clorofenol vermelho

-β - D- galactopiranósido; Roche, Indianapolis, IN, EUA). A atividade da β-galactosidase foi medida a 570 nm utilizando um leitor de microplaca (Titertek Multiskan Plus, Flow Laboratories) e os dados foram mostrados como o número de taquizoítos determinados pelo software Microplate Manager (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA), usando uma curva padrão com concentrações conhecidas de taquizoítos (1×10^6 a $15,625 \times 10^3$). Três experimentos independentes foram realizados em quadruplicata.

3.14 – Cultura de células

3.14.1 - Extração de células mononucleares de sangue periférico humano (PBMC)

Inicialmente 10 mL de sangue periférico foram coletados em tubos heparinizados, de indivíduo saudável, sem uso de terapia farmacológica. O sangue foi transferido para um tubo de 50 mL onde foi acrescentado o mesmo volume (~10 mL) de PBS em temperatura ambiente. Após homogeneização cuidadosa, o sangue foi distribuído em 4 tubos, sendo colocados 5 mL dessa solução em cada tubo. A essa mistura, foram acrescentados 5 mL de Histopaque–1077 (Sigma-Aldrich, 10771), que é uma solução contendo polissacarose e diatrizoato de sódio, ajustado a uma densidade de 1,077 g/mL, facilitando a recuperação de um grande número de células mononucleares viáveis (linfócitos e monócitos), que formam uma camada distinta entre as hemácias e o plasma. Após homogeneização, todo o material foi centrifugado a 400g por 30 min. Após a centrifugação, a fase contendo PBMC foi retirada com a ajuda de uma pipeta *Pasteur*. Estes foram reunidos em um tubo de 15 mL e centrifugados a 400g por 5 min. O sobrenadante foi desprezado e o *pellet* ressuscitado em 5 mL de PBS. Em seguida, o material foi centrifugado nas mesmas condições descritas anteriormente. Novamente, o sobrenadante foi desprezado e o *pellet* foi ressuscitado com cerca de 2 mL de meio RPMI (Gibco, 31800-022) suplementado com 10% de SBF (Gibco, 12657).

3.14.2 – Extração de macrófagos

Macrófagos derivados da medula óssea (MDMO) foram obtidos de camundongos fêmeas BALB/C (com idades entre 7 - 9 semanas) (BRINGMANN et al., 2013). Fêmur e tíbias dos camundongos foram removidos dos músculos circundantes e tecido conjuntivo. Os ossos foram abertos nas epífises sob condições estéreis. A medula óssea foi lavada com uma agulha de calibre 23 com meio RPMI 1640 com SFB a 10% para um tubo Falcon de 50 ml. As células foram centrifugadas (300 x g 4, 10 min) e lavadas com solução salina tamponada com fosfato (PBS) fria. Após uma nova centrifugação (300 g, 4 ° C, 10 min), as células foram ressuspensas em meio condicionado para geração de macrófagos contendo sobrenadante de L929. Os macrófagos (5×10^5 células/poço) foram plaqueadas em placas de cultura de 24 poços contendo meio RPMI 1640 suplementado com 20% de FBS, 1% de penicilina (10.000 UI mL⁻¹) e estreptomicina (10mg mL⁻¹), 1,3% de glutamina - meio RPMI completo - em uma incubadora com 5% de CO₂ a 37°C por 18 h.

3.15 – Ensaio de Invasão

Resumidamente, os macrófagos derivados da medula óssea (MDMO) (5×10^5 células / poço), foram cultivadas numa placa de 24 poços contendo lamínulas de 13 mm em cada poço. Após 24 horas, promastigotas de *L. (L.) amazonensis* não tratados ou tratados com anticorpos anti-BnSP-7 IgY (50×10^5 células / poço) foram adicionados a cada poço. Após três horas de interação, as células foram fixadas com paraformaldeído *overnight*. Por último, as lamínulas foram coradas com corante giemsa.

As lamínulas foram analisadas em microscópio de luz para verificar os seguintes parâmetros: número de células com parasitas invadidos e número total de parasitas invadidos a essas células em um total de 200 células examinadas aleatoriamente. Três experimentos independentes foram realizados em triplicata para cada abordagem de tratamento.

3.16 - Construção do bioeletrodo

Brevemente, eletrodos de grafite de 6 mm de diâmetro foram polidos, modificados com óxido de grafeno reduzido e submetidos a polimerização eletroquímica de tiramina, visando um eletrodo modificado com o nanocompósito óxido de grafeno reduzido/politiramina. A sonda utilizada no presente trabalho caracteriza-se por anticorpos policlonais anti-BnSP-7 IgY, produzidos pelo processo de imunização em galinhas e bem como anticorpos produzidos no grupo controle (imunizados com PBS).

Sobre cada eletrodo de grafite modificado, foram gotejados 20 µL de solução dos anticorpos anti-BnSP-7 (diluídos a uma concentração de 20 µg/mL em solução tampão fosfato salino, pH = 7.4). Os eletrodos foram incubados por 1 hora a 37°C, em recipiente vedado e com umidade controlada, para não ocorrer evaporação da solução. Após a incubação, os eletrodos foram lavados por imersão em solução tampão fosfato salino durante 10 segundos e secos em estufa a 37°C. Com o intuito de impedir interações inespecíficas do alvo com a superfície não modificada do eletrodo, após a imobilização da sonda, a superfície dos mesmos foi bloqueada com albumina de soro bovino (BSA). Para isso, 30 µL de solução de BSA (0.5% m/v em solução tampão fosfato, pH = 7.4) foram gotejados sobre o eletrodo. Os mesmos foram incubados por 1 hora a 37°C, em recipiente vedado e com umidade controlada, lavados por imersão em PBS, pH 7.4 durante 10 segundos e secos em estufa a 37°C. Para verificar a imobilização das biomoléculas, foi realizada uma voltametria de onda quadrada nos eletrodos sem e com biomoléculas. Para isso, os eletrodos foram conectados numa célula eletroquímica de três compartimentos, contendo uma solução de ferro/ferricianeto de potássio ($K_4[Fe(CN)_6]/K_3[Fe(CN)_6].3H_2O$, 5 mmol/L, contendo 0.1 mol/L de KCl). A voltametria de onda quadrada foi realizada numa janela de potencial de -0.1 V a +0.6 V vs. Ag/AgCl, frequência de 15 Hz e amplitude de 25 mV.

3.17 - Detecção da BnSP-7 pelo bioeletrodo

Os eletrodos de grafite modificados e com a sonda imobilizada, tanto com anticorpos policlonais anti-BnSP-7 IgY, e anticorpos produzidos no grupo controle (imunizados com PBS), foram incubados com a fosfolipase A₂ (BnSP-7). Para isso, após o bloqueio, foram gotejados sobre os eletrodos 20 µL de solução de BnSP-7

(diluídos a uma concentração de 10 µg/mL em PBS, pH 7.4). Os eletrodos foram então incubados por 30 minutos a 37°C, em recipiente vedado e com umidade controlada. Após a incubação, os eletrodos foram lavados por imersão em PBS, pH 7.4 durante 10 segundos e secos em estufa a 37°C. A detecção do alvo foi feita por voltametria de onda quadrada em solução de par redox. Para isso os eletrodos foram conectados a célula eletroquímica de três compartimentos, contendo uma solução de ferro/ferricianeto de potássio ($K_4[Fe(CN)_6]/K_3[Fe(CN)_6].3H_2O$, 5 mmol/L, contendo 0.1 mol/L de KCl). A voltametria de onda quadrada foi realizada numa janela de potencial de -0.1 V a +0.6 V vs. Ag/AgCl, frequência de 15 Hz e amplitude de 25 mV.

3.18 - Detecção de alvo em extrato de *L. (L.) amazonensis* pelo bioeletrodo

Para a detecção do alvo em extratos de amostras reais, foram utilizados um controle positivo (extrato bruto de *L. (L.) amazonensis*) e um controle negativo (extrato de células mononucleares de sangue periférico saudável, PBMC, que são as infectadas pelo patógeno). Ambos os extratos foram diluídos para uma concentração proteica final de 10 µg/mL em solução tampão fosfato salino, pH = 7.4. Foram gotejados sobre os eletrodos 20 µL de solução de alvo e incubou-se por 30 minutos a 37 °C, em recipiente vedado e com umidade controlada. Após a incubação, os eletrodos foram lavados por imersão em PBS, pH 7.4 contendo o detergente *Tween* (0.05%, v/v) durante 10 segundos e secos em estufa a 37 °C. Este tampão de lavagem é diferente dos demais para promover uma remoção mais eficiente dos componentes celulares do extrato da superfície do eletrodo. A detecção do alvo no extrato foi feita por voltametria de onda quadrada em solução de par redox. Os eletrodos foram conectados a célula eletroquímica de três compartimentos, contendo a solução de ferro/ferricianeto de potássio ($K_4[Fe(CN)_6]/K_3[Fe(CN)_6].3H_2O$, 5 mmol/L, contendo 0.1 mol/L de KCl). A voltametria de onda quadrada foi realizada numa janela de potencial de -0.1 V a +0.6 V vs. Ag/AgCl, frequência de 15 Hz e amplitude de 25 mV.

3.19 - Análise Estatística

A análise estatística e apresentação dos resultados foram realizados através do programa estatístico GraphPad Prism versão 6.01 (GraphPad Software, La Jolla, EUA). Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão (DP). As variáveis foram analisadas com testes específicos, paramétricos ou não paramétricos, segundo a distribuição de dados. Os dados foram considerados estatisticamente diferentes quando $p < 0,05$.

4.0 – Resultados e Discussão

4.1 – Imunização e Purificação de anticorpos IgY policlonais anti-BnSP-7

Inicialmente, os animais foram imunizados com BnSP-7 e monitorados diariamente. As imunizações foram bem toleradas pelos animais e o experimento foi conduzido ao longo de 11 semanas.

As galinhas de cada grupo de imunização mantiveram a produção de ovos estável ao longo do experimento, variando de 6 a 12 ovos por grupo. Para cada semana de coleta de ovos, foi gerado um *pool* semanal de gemas. A mensuração do conteúdo de gemas revelou um volume média de 15mL/ovo. No presente estudo, cada 1 mL de gema de ovo purificada produziu aproximadamente 6 mg de proteínas totais precipitadas por sulfato de amônio (P2). A concentração proteica média de anticorpos IgY totais, das galinhas imunizadas com a BnSP-7, foi de 4 mg/mL de gema pura.

As gemas agrupadas semanalmente passaram por três etapas distintas de fracionamento para obter os anticorpos IgY específicos. A qualidade do processo de fracionamento do anticorpo foi evidenciada pelo perfil eletroforético de todas as etapas (10 μ g de proteínas) em SDS-PAGE a 12,5%. A adição de 5% de 2-mercaptoetanol efetuou a separação de cadeias pesadas e leves das moléculas IgY (Figura 12A). O sobrenadante isento de lipídeos (S1) e o sedimento enriquecido com IgY (P2) apresentaram bandas correspondentes as cadeias leves e pesadas das moléculas de IgY, ~65 kDa e ~30 kDa respectivamente. Enquanto o *pellet* rico em lipídeos, chamado de P1 e o sobrenadante S2, não apresentam bandas correspondentes às imunoglobulinas demonstrando a eficiência do método de fracionamento escolhido.

Os anticorpos IgY isolados da gema de ovo foram fracionados em coluna HiTrap IgY HP (Figura 12B). O perfil cromatográfico de afinidade demonstrou dois picos: o primeiro representa a fração ligada a coluna, contendo o isolamento dos IgY policlonais e o segundo a fração não ligada a coluna rica em albumina. As bandas correspondentes a fração pura mostrada em nossos resultados de cromatografia correspondeu aos tamanhos esperados de cadeias pesadas (~65 kDa) e leves para IgY (27 kDa) (Figura 12A).

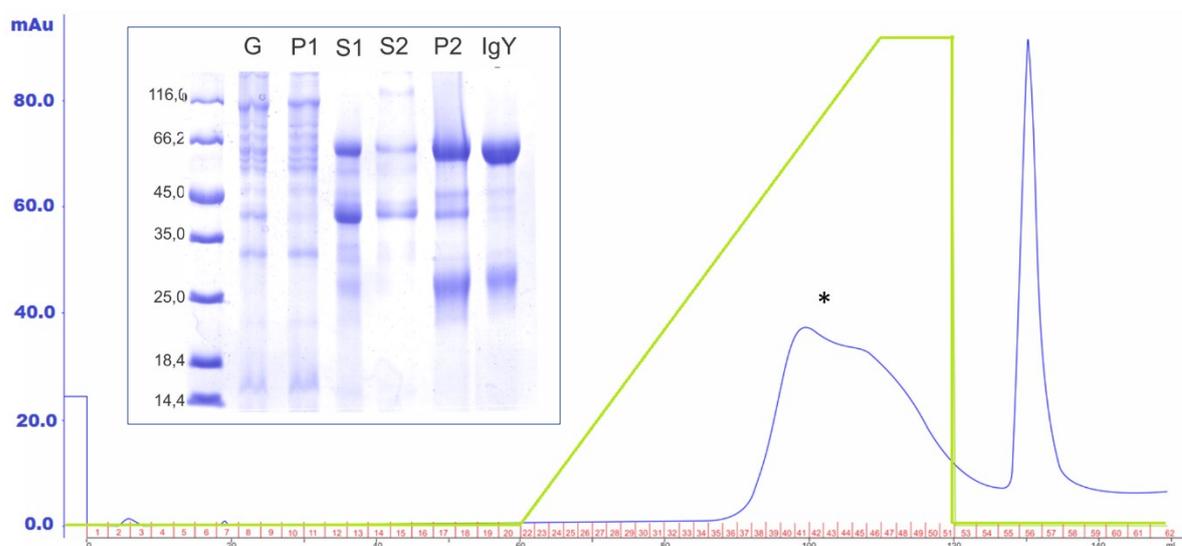


Figura 12: Purificação dos anticorpos IgY anti-BnSP-7: Cromatografia de afinidade em HiTrap IgY para obtenção da IgY anti-BnSP-7; Perfil eletroforético 12,5% (PAGE-SDS) em condições redutoras do extrato total da gema (G), do pellet rico em lipídeos (P1); sobrenadante isento de lipídeos (S1); pellet rico em IgY (P2); e sobrenadante sem IgY (S2); IgY purificada após cromatografia de afinidade e o marcador de massa molecular em kDa (P). A linha verde representa o gradiente de concentração do tampão de eluição. (*) fração contendo as IgYs

Neste estudo foram utilizadas galinhas poedeiras da linhagem *Isa Brown* para a produção de anticorpos IgY policlonais anti-BnSP-7. Tradicionalmente, a via de escolha em protocolos de imunização em galinhas pode ser: a via intramuscular, subcutânea ou intravenosa (ARAÚJO et al., 2010; PARMA et al., 2011; QU et al., 2011; WEN et al., 2012; DA ROCHA et al., 2017). Entretanto, as reações inflamatórias locais e a queda transitória na produção de ovos durante o período de imunizações, são uma preocupação (HATTA et al., 1993; SCHWARZKOPF e

THIELE, 1996). No presente estudo, as imunizações foram realizadas pela via intramuscular e foram escolhidos diferentes locais de inóculo com intuito de reduzir a inflamação local e evitar a redução na produção de ovos (SCHWARZKOPF e THIELE, 1996). Processos inflamatórios locais graves não foram verificados, da mesma forma não houve queda na produção dos ovos.

Todos os tipos de anticorpos encontrados em galinhas são transferidos para a gema dos ovos, mas IgY é o anticorpo predominante e por este motivo, a fonte indicada para o isolamento e purificação de anticorpos IgY é a gema, embora os IgY possam ser purificados a partir de soro (ROSE et al., 1974; LÖSCH et al., 1986). Os ovos podem ser colhidos diariamente da mesma galinha e processados individualmente ou, conforme desejado, em galinhas pertencentes a um grupo imunizado similar (DA SILVA et al, 2010). A fim de obter amostras homogêneas, optamos por processar os anti-BnSP-7 a partir de um *pool* dos ovos coletados semanalmente.

A gema de ovo é uma matriz complexa composta por lipídios (31% de gema) e proteínas (17% de gema). As proteínas da gema podem ser granulosas (precipitam na centrifugação) ou plasmáticas (obtidas no sobrenadante após centrifugação), onde IgY são predominantes na fração plasmática (GADDE et al., 2015). A extração de IgY consiste na remoção de lipídios para formar uma fração solúvel em água, seguida pela precipitação dos anticorpos nela contidos (PEREIRA et al., 2019). Métodos relativamente simples podem ser usados para extrair a imunoglobulina antígeno-específica da gema de ovo. Os mais utilizados para a obtenção da fração solúvel incluem o método de diluição da água e a precipitação com polietilenoglicol (PEG), ultrafiltração (JENSENIUS et al., 1981; KO et al., 2007; SCHADE et al., 2005; MEULENAER e HUYGHEBAERT, 2001).

Outros métodos adicionais para a purificação de IgY a partir da fração solúvel podem ser realizadas com sais como sulfato de sódio e amônio (AKITA e NAKAI, 1993), cromatografia (YAZAWA et al., 1991; KURONEN et al., 1997; FASSINA et al., 1998) e filtração (KIM e NAKAI, 1996). A pureza de IgY pode ser aumentada pela combinação dos métodos acima, seguida por cromatografias de afinidades (SCHADE et al., 2005). O método de purificação de IgY apropriado é influenciado principalmente pela escala de extração (laboratório ou industrial), qualidade da extração, custo-eficácia e tecnologia (SCHWARZKOPF et al., 1996; SCHADE et

al., 2005; CHALGHOUMI et al., 2009). Porém, devido à rapidez e alta seletividade, a cromatografia por afinidade é um dos métodos mais amplamente utilizados para a purificação de anticorpos (AYYAR et al., 2012).

Para este estudo foi realizado três processos de purificação das imunoglobulinas das gemas: diluição em água da gema, precipitação por sulfato de amônio e a cromatografia de afinidade HiTrap IgY HP. Após a análise em SDS-PAGE, verifica-se que as IgY purificadas se mostraram homogêneas, indicando que a combinação entre os métodos foi muito importante para obtenção das imunoglobulinas puras. O protocolo de fracionamento utilizado também demonstrou um alto rendimento de anticorpos IgY (4 mg). Estes valores correspondem às estimativas de anticorpos IgY passivamente transferidos através do folículo ovariano de galinhas imunizadas (2-8 mg / mL) de gema purificada (SCHADE et al., 2005; LESNIEROWSKI e STANGIERSKI, 2018).

4.2 – Produção de anticorpos IgY policlonais anti-BnSP-7 com alta avidéz

A reatividade dos anticorpos IgY antígeno-específicos da gema de ovo e do soro, bem como a maturação de sua avidéz durante o tempo de imunização foram monitorados por ELISA indireto (Figura 13).

Observamos que a partir da terceira semana após a imunização primária houve um aumento no título dos anticorpos específicos anti-BnSP-7 presente na gema de ovo (EI = 4,6). A partir da quarta semana, a produção de IgY anti-BnSP-7 aumentou (EI= 8,4) e o nível permaneceu estável durante todo o período de imunização (Figura 13A). No soro, observamos um aumento do título de anticorpos anti-BnSP-7 a partir da sexta semana após a primeira imunização que se manteve estável até a decima primeira semana (Figura 13A). Os anticorpos de semanas com altos títulos foram utilizados em testes de caracterização e aplicabilidade.

A maturação da avidéz dos anticorpos anti-BnSP-7 IgY, foi avaliada após o tratamento dos imunocomplexos com ureia 6M, por meio do cálculo do índice Avidéz (IA). Apenas semanas que apresentaram $EI > 1,2$ foram selecionadas. Os resultados foram expressos como índice de avidéz (IA).

O IA médio revelou que os anticorpos IgY anti-BnSP-7 tiveram seu índice mais baixos da terceira a quinta semana e aumento da sexta semana em diante.

Na terceira semana pós-primeira imunização os anticorpos retiveram 64% da reatividade. Na quarta e quinta semana após a segunda imunização houve uma redução na reatividade para 61% e em seguida um aumento para 69% respectivamente. Na sexta e sétima semana os IA médios foram de 78 e 76%, e na oitava semana houve uma elevação para 85% na reatividade. Em seguida seguiu-se com valores médio de 72% para a nona a décima primeira semana (Figura 13B).

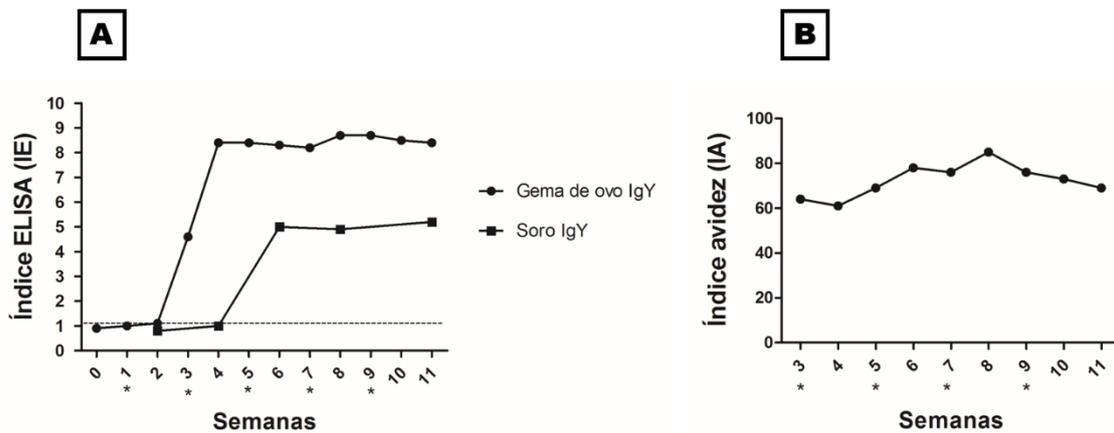


Figura 13: ELISA indireto para monitoramento da cinética de produção de anticorpos IgY específicos de gemas de ovos e soro de galinhas imunizadas; **A** - ELISA indireto para monitoramento da cinética de produção dos anticorpos; **B**- ELISA indireto do índice de avidéz (%) dos anticorpos IgY da gema de ovo tratados com ureia 6M. * - Imunizações. A linha tracejada representa o limite de detecção de IE = 1,2.

A imunidade passiva natural envolve a transferência de anticorpos maternos para a prole para se defender contra patógenos invasores. Em aves, os anticorpos maternos na circulação (IgY) são depositados na gema do ovo e transferidos para o embrião em desenvolvimento através da circulação embrionária (PATTERSON et al., 1962; ROSE et al., 1974; WARD et al., 2004).

Um aumento no título de anticorpos da gema de ovo pode ser observado a partir da segunda semana (SUI et al., 2011; WEN et al., 2012) ou às vezes a partir da quinta semana após a inoculação de antígeno (GRZYWA et al., 2014). Em seguida, a estabilização do título de anticorpos ocorre, atingindo um patamar e, a partir daí, diminui progressivamente (WEN et al., 2012). Através de inoculações de reforço, é possível manter altos títulos de anticorpos da gema de ovo por mais de 150 dias (MEENATCHISUNDARAM et al., 2011). Contudo, os títulos de anticorpos

são influenciados por diversos fatores, como tipo e dose do antígeno, adjuvante utilizado, via de aplicação, frequência de inoculação, idade e estágio de desenvolvimento das aves (SCHADE et al., 2005; CHALGHOUM et al., 2009).

Normalmente, para a avaliação da cinética de produção, especificidade e avides de anticorpos IgY são utilizados ensaios imunoenzimáticos indiretos (ELISA) (da ROCHA et al., 2017; AKBARI et al., 2018; LEIVA et al., 2019). No presente estudo, as quantidades de anticorpos IgY anti-BnSP-7, foram estimadas através de Índice ELISA (IE), após a imunização das galinhas com a BnSP-7, e foi observada resposta humoral clássica compreendendo uma resposta primária com baixo título de anticorpos, seguida por uma resposta secundária aumentada. Os anticorpos específicos foram detectados a partir da terceira semana pós-imunização primária e foram da quarta semana a décima primeira se mantiveram constantes ao longo do protocolo de imunização.

Essa típica resposta humoral também foi observada em diferentes estudos na produção de anticorpos anti-peçonhas de serpentes (ANDRADE et al., 2013; DUAN et al., 2016; LEE et al., 2016; LEE et al., 2017; LIU et al., 2017; AMRO et al., 2018). Sifi e colaboradores, 2018 demonstraram a produção de anticorpos IgY contra a peçonha de escorpião de *Androctonus australis hector*. No estudo, a produção de anticorpos aumentou progressivamente durante o período de imunização e atingiu um patamar de 6 a 11 semanas após a imunização primária.

A detecção de anticorpos IgY na gema, ocorre com um atraso de aproximadamente sete dias, depois da detecção sérica dos anticorpos. Este fenômeno ocorre devido ao tempo requerido para o desenvolvimento do folículo ovariano e ovopostura (PEI e COLLISSON, 2005; DAVISON et al., 2008). A detecção dos anticorpos anti-BnSP-7 foi observada a partir da sexta e terceira semana no soro e na gema de ovo respectivamente.

Em contradição com os resultados apresentados, Liu e colaboradores (2017) obtiveram o aumento do título de anticorpos IgY anti-*Deinagkistrodon acutus* a partir do oitavo dia no soro e no 15º dia foi observada a transferência de anticorpos específicos da peçonha de *D. acutus* do soro para a gema de ovo. Contudo, Leiva e colaboradores (2019) detectaram anticorpos específicos contra a peçonha de *Botrops alternatus* no soro quinze dias após a primeira imunização.

Estudos científicos demonstram uma discrepância quanto à concentração de IgY na gema de ovo e no soro. Alguns pesquisadores afirmaram que não há diferença entre eles, enquanto outros demonstraram que a concentração de IgY na gema é maior do que no soro (SCHADE et al., 2005). He e colaboradores (2014) demonstraram flutuações biológicas distintas nos níveis de IgY no soro e na gema ao longo de 60 dias do período do estudo. Eles sugerem que devido à diferença nos ritmos do soro e da gema IgY, essas flutuações influenciam as discrepâncias de concentração de IgY total e a relação entre IgY no soro e na gema. Outros fatores que podem influenciar nas variações nos níveis de IgY são as linhas genéticas ou raças de galinhas, métodos de purificação e técnicas de avaliação.

Por outro lado, os anticorpos IgY podem desenvolver, precocemente, a maturação da avidéz, logo após a resposta imune primária (WOOLLEY e LANDON, 1995). A maturação de avidéz de um anticorpo representa uma interação de afinidade crescente entre anticorpos e antígenos. O alto grau de afinidade entre o anticorpo e o antígeno foi demonstrado neste trabalho pelo índice de avidéz, considerando IA <40% como baixa avidéz e IA > 60% como alta avidéz (VILIBIC-CAVLEK et al., 2016). Durante os estágios iniciais da resposta imune, há produção de anticorpos com baixa avidéz; subsequentemente, há um aumento progressivo da avidéz em galinhas após várias imunizações (INOUYE et al., 1984; BOLLEN et al., 1996). Neste estudo, as galinhas imunizadas com BnSP-7 produziram grandes quantidades de anticorpos policlonais anti-BnSP-7 IgY de alta avidéz como esperado.

4.3 – Os anticorpos IgY anti-BnSP-7 reconhecem epítomos descontínuos na sequência da BnSP-7

Após a avaliação do reconhecimento dos anticorpos IgY policlonais contra seu antígeno (BnSP-7), foi testado o reconhecimento em aspecto estrutural afim de analisar a capacidade dos anticorpos reconhecerem epítomos contínuo ou descontínuo nas estruturas das proteínas. A proteína alvo (BnSP-7) foi submetida a desnaturação (100°C por 10min, 5% β-mercaptoetanol e 2% SDS) para obtenção da estrutura primária. O reconhecimento anticorpos IgY anti-BnSP-7 frente aos epítomos contínuo ou descontínuo foram analisados pelo ensaio de ELISA indireto.

Os anticorpos IgY anti-BnSP-7 reconheceram a proteína alvo em sua estrutura nativa (EI = 25,51), mas não foram capazes de reconhecer a mesma proteína em estrutura primária (EI = 0,8) (Figura 14).

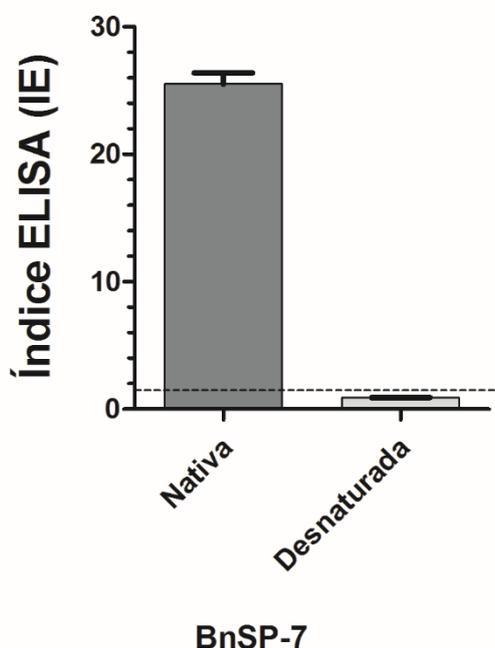


Figura 14: ELISA indireto conformacional para análise de reconhecimentos de epítomos contínuos e descontínuos utilizando a proteína alvo (BnSP-7) nativa e desnaturada. Os resultados são apresentados como média e desvio padrão. A linha tracejada representa o limite de detecção de IE = 1,2

As interações antígeno-anticorpo são realizadas quando o parátipo do anticorpo se liga ao epítipo de um antígeno. Essas interações são mantidas por forças fracas (interações não-covalentes), como forças iônicas, pontes de hidrogênio, van der Waals e hidrofóbicas (VAN REGENMORTEL, 2001; MAK e SAUNDERS, 2006; DA ROCHA et al., 2017). O reconhecimento imunológico ocorre em nível molecular e é baseado na complementaridade entre a região de ligação do receptor e uma porção do antígeno, o epítipo (MENDEL et al., 1996).

Quando o antígeno é proteico, os epítomos podem ser lineares (contínuos) ou conformacionais (descontínuos). O epítipo contínuo, também chamado sequencial ou linear, apresenta pequenas sequências contínuas de resíduos de aminoácidos do antígeno. Já um epítipo descontínuo, igualmente chamado de epítipo conformacional, são compostos por resíduos de aminoácidos dispersos ao

longo da sequência da proteína e reunidos na proximidade espacial quando a proteína é enovelada, adquirindo conformação nativa (BARLOW et al., 1986; HUANG e HONDA, 2006).

Muitos anticorpos provavelmente reconhecem epítomos descontínuos mais complexos, onde resíduos de diferentes regiões da proteína são trazidos à proximidade espacial por dobramento da proteína para formar um epítomo de anticorpo funcional (LAVIER et al., 1990; VAN REGENMORTEL, 2001). A identificação dos epítomos é de grande importância para compreender e reconhecer molecularmente a proteína analisada. Esses epítomos podem ser úteis em diagnóstico de doenças, na formulação de drogas, projetos de vacinas, entre outros (VAN REGENMORTEL, 2001).

Os estudos estruturais identificam os epítomos estruturais, também chamados de determinantes antigênicos, definidos por um conjunto de resíduos ou átomos na proteína antigênica que estão em contato com resíduos ou átomos do anticorpo. Enquanto, os epítomos funcionais são determinados através de ensaios funcionais, e consistem em resíduos de antígenos que contribuem significativamente para ligação ao anticorpo (SUNDBERG e MARIUZZA, 2004). Epítomos funcionais em proteínas são geralmente menores do que os epítomos estruturais; apenas três a cinco resíduos do epítomo estrutural contribuem de modo significativo para a energia de ligação antígeno-anticorpo (CUNNINGHAM e WELLS, 1993).

Os anticorpos anti-BnSP-7 reconhecem epítomos descontínuos uma vez que só foi possível o reconhecimento da proteína alvo na sua conformação nativa. Ao desnaturar a proteína, obtivemos sua estrutura linear, e conseqüentemente perda dos epítomos conformacionais, e, portanto, a perda do reconhecimento da proteína alvo. Estudos futuros são necessários a fim de obter as sequências dos epítomos conformacionais para o melhor entendimento e aplicação terapêutica em ensaios de neutralização.

4.4 – Os anticorpos IgY anti-BnSP-7 são capazes de reconhecer diferentes fosfolipases A₂

Anticorpos purificados (IgY anti-BnSP-7) foram testados quanto a sua capacidade de reconhecer diferentes PLA₂s isoladas de peçonhas de *Bothrops pauloensis* e *Bothrops jararacussu*. Os anticorpos IgY anti-BnSP-7 foram capazes de reconhecer a proteína nativa (BnSP-7) com um IE de 13,61 (Figura 15).

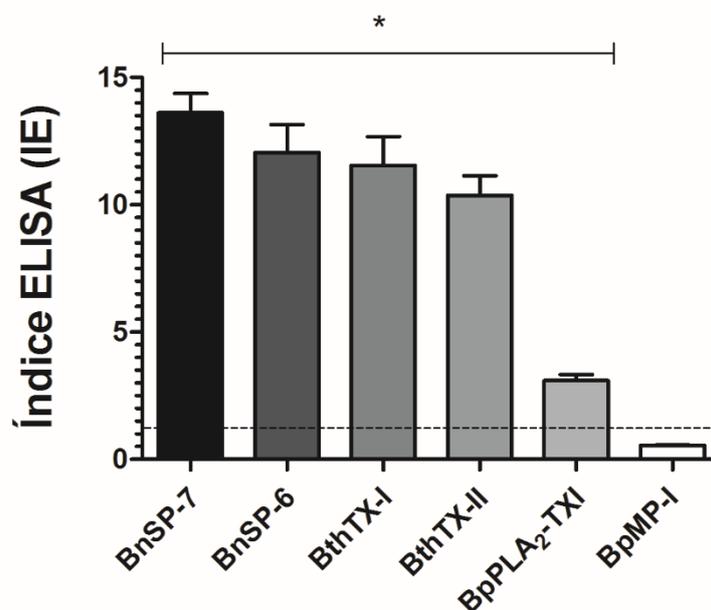


Figura 15: Reatividade cruzada de anticorpos policlonais IgY anti-BnSP-7 pelo ensaio ELISA indireto contra diferentes fosfolipases A₂ de *B. pauloensis*, *B. jararacussu* e BpMP-I (metaloprotease) da peçonha de *B. pauloensis*. Os resultados são apresentados como média e desvio padrão. (*) Diferenças significativas entre as fosfolipases A₂ e BpMP-I (controle negativo) ($p < 0,05$; ANOVA). A linha tracejada representa o limite de detecção de IE = 1,2.

Outras PLA₂s isoladas (BnSP-6, BthTX-I, BthTX-II, BpPLA₂-TXI) também foram reconhecidas, com os respectivos IE de 12,05, 11,55, 10,37 e 3,1. Para analisar a especificidade dos anticorpos produzidos, utilizou-se também uma toxina irrelevante pertencente à classe das metaloproteínas (BpMP-I). A proteína BpMP-I não foi reconhecida pelos anticorpos anti-BnSP-7 IgY e obteve um baixo IE de 0,54 (Figura 15).

As sPLA₂s de peçonha ofídica são subdivididas em dois grupos principais, como já mencionado: (i) PLA₂s Asp49, que exibem um resíduo Asp na posição 49, com atividade catalítica relativamente alta em substratos artificiais; (ii) variantes Lys49 PLA₂s, mostrando um resíduo Lys na posição 49, com baixa ou nenhuma atividade catalítica (LOMONTE et al., 2003).

De acordo com nossos resultados, os anticorpos específicos produzidos apresentaram maiores IEs para PLA₂s Lys49 (BnSP-6, BthTX-I) e relativamente menores para Asp49 (BthTX-II, BpPLA₂TX-I). Como a maioria das PLA₂s testadas compartilham muitas semelhanças estruturais (SOARES et al., 2000; MAGRO et al., 2003; FERREIRA et al., 2013), é altamente provável que diferentes regiões tenham sido favorecidas durante a seleção dos epítomos para a produção de anticorpos, provocando o reconhecimento das diferentes PLA₂s testadas. O reconhecimento de PLA₂s foi significativamente ($p < 0,05$) maior que o da proteína metaloprotease. Nossos resultados mostram que os anticorpos anti-BnSP-7 IgY são altamente específicos para PLA₂s de peçonha de serpentes, o que pode representar uma ferramenta potencial para o reconhecimento da presença de PLA₂s em diferentes organismos (Figura 15).

Melo e colaboradores (2017) produziram anticorpos policlonais anti-BnSP-7 em camundongos BALB/C e testaram o seu potencial no reconhecimento de proteína nas peçonhas de *Bothrops pauloensis*, *Bothrops moojeni*, *Bothrops diporus*, *Bothrops jararaca* e *Bothrops alternatus*, por ELISA e *Western Blotting*. Os anticorpos policlonais IgG anti-BnSP-7 reconheceram as peçonhas *B. pauloensis* e *B. moojeni*, mas não foram capazes de reconhecer proteínas na peçonha de *B. diporus*, *B. jararaca* e *B. alternatus*. Os anticorpos IgY anti-BnSP-7 produzido neste trabalho foram capazes de reconhecer as diferentes fosfolipases A₂ isoladas da peçonha de *B. pauloensis* e de *B. jararacussu* com altos valores de EI.

Outros trabalhos demonstram a produção de anticorpos IgY anti-peçonhas e o seu potencial de reconhecimento sobre diferentes proteínas nas peçonhas ofídicas (LEE et al., 2017; DA ROCHA et al., 2017; SIFI et al., 2018; LEIVA et al., 2019). O padrão de reconhecimento de proteínas de baixo peso, como as fosfolipases A₂ por anticorpos IgY imunizados com peçonhas de animais, são controversos. da Rocha e colaboradores (2017) produziram IgY anti-peçonha de *Bitis arietans* e anti-peçonha de *Crotalus durissus terrificus* e demonstraram um forte reconhecimento de complexos proteicos com baixa massa molecular que podem incluir a PLA₂. Contudo, anticorpos IgY anti- *Bothrops alternatus* reconheceu fracamente bandas de baixa massa molecular (menos de 15 kDa) (LEIVA et al., 2019).

Em geral, os componentes da toxina de baixa massa molecular são menos imunogênicos quando comparados aos de alta massa molecular (LAUSTSEN et al., 2017). Através da imunização com uma fosfolipase A₂ pura isolada da peçonha de *B. pauloensis* (BnSP-7), demonstramos uma produção efetiva de anticorpos anti-PLA₂.

4.5 – Anticorpos IgY anti-BnSP-7 neutralizam a atividade citotóxica da BnSP-7 em células C2C12

A fim de verificar a capacidade de anticorpos IgY anti-BnSP-7 para neutralizar os efeitos de PLA₂s, o nosso próximo passo foi avaliar a neutralização da citotoxicidade induzida por BnSP-7 para células C2C12. A BnSP-7 é uma PLA₂ capaz de induzir edema e necrose de fibras musculares, liberando creatina quinase do músculo gastrocnêmio de camundongos, apresentando atividade bactericida contra *Escherichia coli* (RODRIGUES et al., 1998; SOARES et al., 2000; MAGRO et al., 2003; OLIVEIRA et al., 2009) e ação antiparasitária (NUNES et al., 2013; BORGES et al., 2016), entre outras atividades (RORIGUES et al., 2015).

Os anticorpos policlonais anti-BnSP-7 foram capazes de neutralizar significativamente ($p < 0,05$) a atividade citotóxica da BnSP-7 quando pré-incubada com BnSP-7 ($\mu\text{g/mL}$) a 37°C por 1 h a 1:1, 1:2,5 e 1:5 (toxina: anticorpo, m/m) (Figura 16). As células também foram tratadas apenas com anti-BnSP-7 IgY (250 μg) para analisar se os anticorpos tinham efeito sobre as células C2C12 e como resultado, nenhum efeito citotóxico causado pelos anticorpos anti-BnSP-7 IgY nas células C2C12 foi observado.

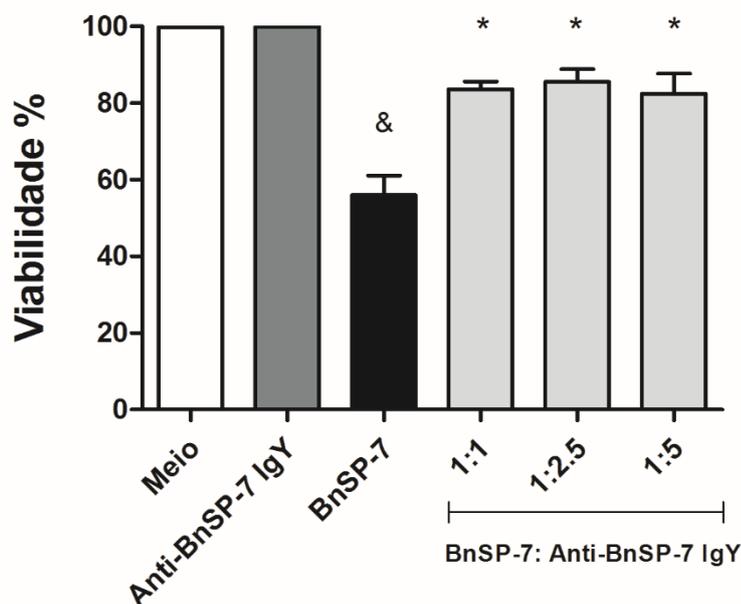


Figura 16: Determinação da atividade neutralizante de anticorpos IgY anti-BnSP-7 sobre o efeito citotóxico da BnSP-7 em células musculares C2C12 pelo ensaio MTT. A BnSP-7 (50 µg / mL) foi pré-incubada com os anticorpos anti-BnSP-7 IgY em diferentes proporções (toxina: anticorpo, m/m), por 1 h a 37 ° C. Os resultados são apresentados como média e desvio padrão. O meio RPMI e anti-BnSP-7 IgY (250 µg) foram utilizados como controle positivo para viabilidade celular. (&). Diferenças significativas entre a BnSP-7 e o meio ($p < 0,05$, ANOVA). (*) Diferença significativa entre a BnSP-7 e as proporções (1: 1, 1: 2,5 e 1: 5) ($p < 0,05$, ANOVA).

Em acordo com os nossos dados, Melo e colaboradores (2017) demonstraram que anticorpos IgG anti-BnSP-7 foram capazes de inibir a atividade miotóxica induzida pela peçonha de *B. pauloensis*, *B. moojeni* e da BnSP-7, avaliada pela liberação da enzima creatina quinase muscular no plasma.

A base molecular da neutralização de toxinas por anticorpos pode ser explicada pelo bloqueio das regiões moleculares das toxinas responsáveis por suas ações. Os anticorpos podem reconhecer epítomos presentes em regiões responsáveis pelo efeito tóxico da proteína, induzindo impedimentos estéricos. (MÉNEZ, 1991; GUTIÉRREZ et al., 2003; GUTIÉRREZ et al., 2007). De Lima e colaboradores (2017) demonstraram que o mecanismo de ação da BnSP-7 depende de duas regiões principais: (i) o domínio de ancoragem na membrana

plasmática (K¹⁶K²⁰K¹¹⁵R¹¹⁸ - MDoS) e (ii) o domínio de desestabilização da membrana (L¹²¹F¹²⁵- MDiS) e, portanto, o impedimento do acesso dessas regiões à membrana, podem levar a perda de atividade biológica dessa proteína.

Alves e colaboradores (2019) realizaram análise da predição *in silico* de potenciais epítomos de células B presentes na BnSP-7 utilizando as plataformas IEDB, Bcepred e Bepipred. Os autores identificaram 5 prováveis epítomos identificados pelas células B na estrutura da BnSP-7. Duas delas, ¹¹QETGKNPAKS²¹ e ¹¹⁴NKKYRYHLKPFCKKADPC¹³³ representam, respectivamente, o final da α -hélice N-terminal e o loop C-terminal da BnSP-7. Essas regiões contribuem para a conformação dimérica da proteína no seu estado nativo, podendo adquirir uma conformação alternativa na presença do substrato no canal hidrofóbico, na qual ocorre uma reorientação das cadeias laterais presentes nas regiões N e C-terminais que expõe aminoácidos catiônicos e hidrofóbicos para o mesmo plano, em posições simétricas, em ambos os monômeros formando o domínio de ancoragem na membrana plasmática (K¹⁶K²⁰K¹¹⁵R¹¹⁸ - MDoS) e o domínio de desestabilização da membrana (L¹²¹F¹²⁵- MDiS).

Pode-se observar que os epítomos selecionados apresentam aminoácidos presentes nos domínios MDoS e MDiS componente na estrutura da BnSP-7, corroborando com nossos dados de identificação da proteína alvo pelos anticorpos IgY anti-BnSP-7 apenas na sua estrutura nativa (identificação de epítomos descontínuos) e com a neutralização da atividade miotóxica da BnSP-7 *in vitro*. Provavelmente um dos epítomos favorecidos durante o processo de imunização em galinhas continha os aminoácidos presentes nos domínios MDoS e MDiS, e o bloqueio dessas regiões moleculares pelos IgY anti-BnSP-7 tenha causado a inatividade da proteína. Porém, experimentos futuros devem ser realizados a fim de identificar as regiões exatas da proteína a serem reconhecidas pelos anticorpos.

Os outros epítomos, ²⁶GCNCGVLG³³, ⁵³KKLTGCDPKKDRYS⁷⁴ e ⁸⁵GENNPCLKE⁹³ estão localizados na região de ligação do Ca²⁺, no final da segunda alfa hélice e no início da terceira alfa hélice da BnSP-7, respectivamente. De-Simone e colaboradores (2013) demonstraram que a região ²⁷CNCG³⁰ apresentam aminoácidos conservados tanto na estrutura das PLA₂s Asp49 quanto em Lys49 que fazem parte do sítio de ligação do cálcio presente em ambas estruturas. Esses resultados também corroboram com os dados apresentados

neste estudo, demonstrando uma possível explicação do reconhecimento de diferentes fosfolipase A₂ isoladas de peçonhas de serpentes apresentados no item 4.4.

Muitos estudos anti-venômicos mostraram que a produção de IgY policlonais produzidos em galinhas são uma excelente fonte alternativa da soroterapia para acidentes ofídicos, principalmente devido ao seu potencial para neutralizar os componentes da peçonha (ZHANG, 2003; FU et al., 2006; ARAÚJO et al., 2010; MOUSSA et al., 2012; ANDRADE et al., 2013; ALVAREZ et al., 2013; NAVARRO et al., 2016).

4.6 – Anticorpos IgY anti-BnSP-7 detectam alvos nos extratos bruto e solúvel de *L. (L.) amazonensis* e *T. gondii*

Como os anticorpos anti-BnSP-7 IgY foram capazes de reconhecer diferentes PLA₂s de peçonha de serpentes e mostraram um potencial neutralizante, avaliamos seus efeitos antiparasitários sobre *T. gondii* e *L. (L.) amazonensis*. Inicialmente, verificamos sua capacidade de reconhecer proteínas presentes nos extratos bruto e solúvel desses parasitas.

Na Figura 17, pode-se notar que os anticorpos policlonais foram capazes de reconhecer proteínas nos diferentes extratos parasitários, apresentando IE de 1,73 (Figura 17A) e 2,76 (Figura 17B) para *L. (L.) amazonensis* e EI de 1,93 (Figura 17C) e 3,13 (Figura 17D) para extratos bruto e solúvel de *T. gondii*, respectivamente. O fato interessante é que o reconhecimento foi maior (IE alto) quando em extratos solúveis em relação à forma bruta, possivelmente devido a uma maior concentração de proteínas no primeiro quando comparado a outros componentes presentes no último, o que favoreceu o reconhecimento de supostas PLA₂s. Os anticorpos IgY imunizados com PBS, usados como controle negativo, não foram capazes de reconhecer proteínas em diferentes extratos de parasitas.

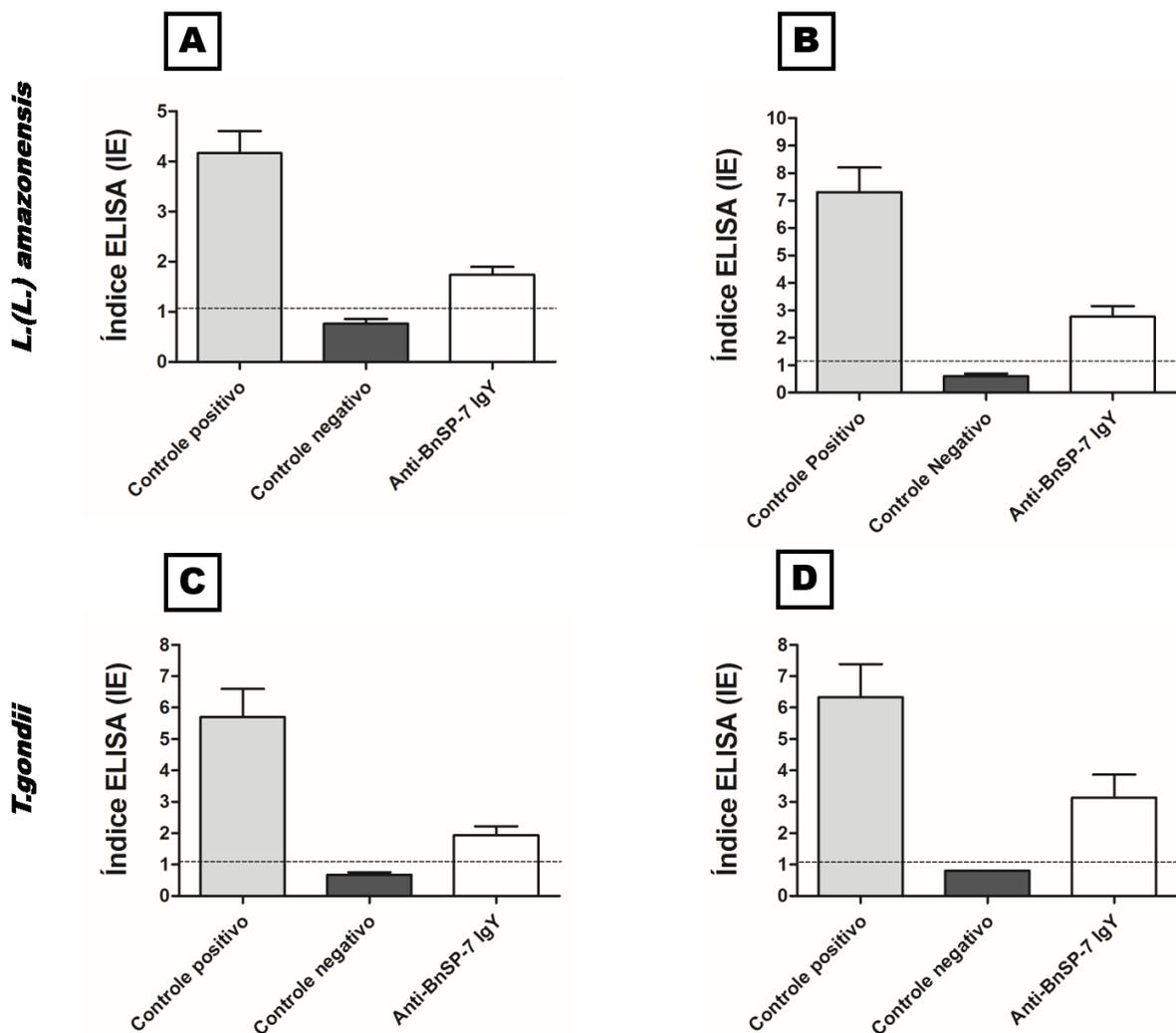


Figura 17: Reconhecimento de alvodo por anticorpos IgY anti-BnSP-7 em extratos bruto e solúvel de *T. gondii* e *L. (L.) amazonensis* por ELISA indireto. **A-** Extrato bruto de *L. (L.) amazonensis*. **B -** Extrato solúvel de *L. (L.) amazonensis*. **C -** Extrato bruto de *T. gondii*. **D -** Extrato solúvel de *T. gondii*. IgY anti-Leishmania e anti-T. Anticorpos gondii foram utilizados como controle positivo. Os anticorpos IgY imunizados com PBS foram utilizados como controle negativo. Os resultados são apresentados em EI com média e desvio padrão. A linha tracejada representa o limite de detecção de IE = 1,2

Alguns estudos têm relatado a presença de fosfolipases em parasitos. Em *T. brucei*, uma fosfolipase A₁ foi purificada a partir das formas da corrente sanguínea onde a maior parte foi encontrada como uma atividade solúvel no citosol e a menor como uma atividade ligada à partícula associada aos marcadores lisossomais (OPPERDOES e VAN ROY, 1982). No mesmo sentido a PLA₁ denominada TbPLA₁

foi localizado no citosol com atividade ótima em pH neutro e tamanho previsto de 34,8 kDa (RICHMOND e SMITH, 2007). A caracterização de PLA₂ também é descrita em *T. congolense*, onde a enzima parece existir em uma forma dimérica com subunidades de massas moleculares de 16,5 e 18 kDa (NOK et al., 1993); e em *T. brucei* foi descrita a atividade da PLA₂ que pode ser estimulada por Ca²⁺ e regula a liberação de ácido araquidônico (TIZARD et al., 1978; HAMBREY et al., 1981).

Há relatos sobre o papel de PLAs em espécies de *Leishmania* e *Toxoplasma gondii*. Foi descrita a atividade de uma PLA₁ hidrolisando fosfolípidios em formas promastigota de *L. braziliensis* e, em *T. gondii* foi demonstrado que as PLA₂ secretadas estão envolvidas no processo de invasão da célula hospedeira (CROSS, 1975, SAGE et al., 1981; BOWES et al., 1993). Curiosamente a secreção das PLAs é aumentada em formas parasitárias associadas a estágios infecciosos. Um dos primeiros estudos realizado por Tizard et al (1978) descreveram a presença de atividade hemolítica em *T. congolense*, devido aos ácidos graxos livres gerados pela ação de PLAs sobre a fosfatidilcolina endógena, enquanto que em *T. lewisi* não patogênico, não foi observada geração de ácidos graxos livres e, portanto, atividade não hemolítica foi detectada. Em *T. cruzi* também foi observado a secreção de uma fosfolipase A₁ para o meio extracelular apenas nos estágios infecciosos (BELAUNZARÁN et al., 2007).

Nossos dados demonstraram o reconhecimento em extratos solúveis e brutos de *L. (L.) amazonensis* e *T. gondii*, sendo um reconhecimento maior em extratos solúveis para ambos parasitos. Talvez os anticorpos possam reconhecer as PLAs solúveis nos extratos já que utilizamos apenas formas infecciosas como promastigotas e taquizoitos. Porém, estudos futuros são necessários a fim de confirmar a sequência das proteínas reconhecidas. Técnicas de imunoprecipitação ou a montagem de colunas de afinidade utilizando anticorpos IgY anti-BnSP-7 em conjunto com técnicas de sequenciamento por MS/MS, representam uma boa estratégia para ensaios futuros.

4.7 – Anticorpos IgY anti-BnSP-7 detectam alvos na membrana de *L. (L.) amazonensis* e *T. gondii*

Para investigar a localização da ligação de anticorpos IgY anti-BnSP-7 a alvos celulares em parasitas, foram realizados ensaios de imunofluorescência. Para estes ensaios foram realizadas duas abordagens: uma em que parasitas fixados em lamínulas de vidro foram permeabilizados e outra em que parasitas fixados em lamínulas de vidro não foram permeabilizados.

Nestes resultados, os taquizoítos de *T. gondii* apresentaram uma fluorescência intensa em toda a superfície do parasita nas duas abordagens e não observamos diferença na fluorescência na abordagem com os parasitos permeabilizados. Quanto à *L. (L.) amazonensis*, na abordagem não permeabilizada apresentou intensa fluorescência na superfície promastigota. Por outro lado, quando permeabilizados houve uma fluorescência que se estendeu ao citoplasma do parasita. Também usamos anticorpos IgY imunizados com PBS como controle negativo. Nesta condição, os anticorpos foram incapazes de reconhecer alvos nos parasitas (Figura 18).

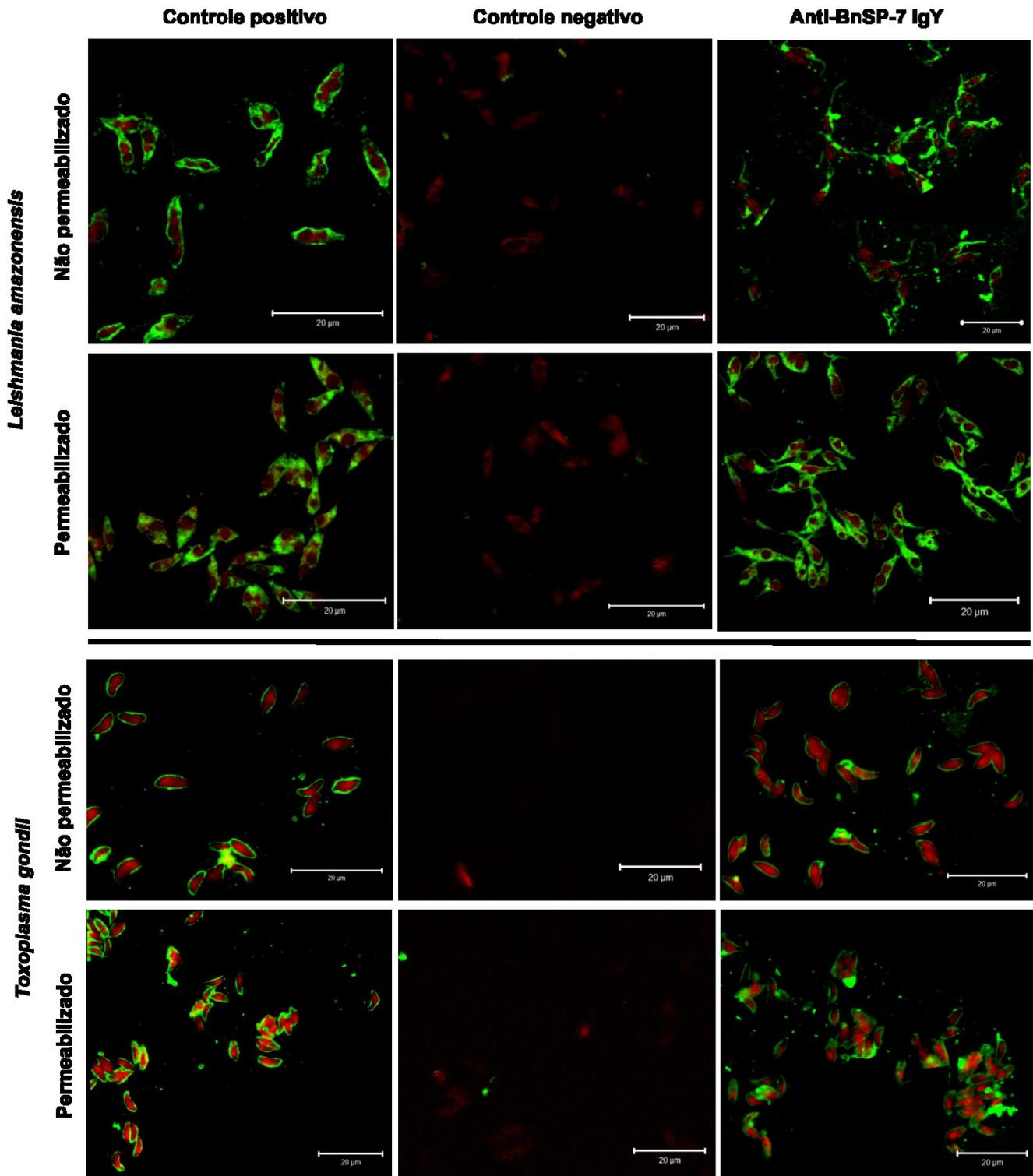


Figura 18: Ensaio de anticorpos imunofluorescentes utilizando anticorpos anti-BnSP-7 IgY em *L. (L.) amazonensis* e *T. gondii* submetidos a permeabilização ou não. Verde representa isotiocianato de fluoresceína IgY anti-chicken conjugado (FITC); Vermelho representa azul Evans. Os anticorpos IgY anti-Leishmania e anti-*T. gondii* foram utilizados como controle positivo. Os anticorpos IgY imunizados com PBS foram utilizados como controle negativo.

Um dos principais componentes das biomembranas presentes em todos os organismos vivos são os fosfolipídios, que formam a bicamada lipídica e servem como âncoras hidrofóbicas das proteínas da membrana. Esses compostos podem ser modificados enzimaticamente pela ação das fosfolipases (PLAs), com geração de moléculas lipídicas bioativas que podem atuar como segundos mensageiros e modular a resposta imune (AOKI et al., 2007; BURKE e DENNIS, 2009). Na maioria dos organismos, diferentes classes de PLAs, incluindo a fosfolipase A₁ (PLA₁), a fosfolipase A₂ (PLA₂), a fosfolipase C e a fosfolipase D, estão envolvidas na degradação e remodelação dos lipídeos de membrana (TIZARD et al., 1978; HAMBREY et al., 1980; PAWLOWIC e ZHANG, 2012).

Em *L. major* foi relatado atividades de degradação da PLA₂, e sua atividade pode estar envolvida na biossíntese do lipofosfoglicano (LPG), a macromolécula principal na superfície da promastigota pró-cíclica (SMITH et al., 1997). O LPG permite que o parasita entre no macrófago explorando os receptores do complemento do hospedeiro (SCHNEIDER et al., 1990). Observou-se também, que modificações na composição de fosfolipídios de macrófagos infectados por *L. amazonensis* podem ser atribuídas à ação de uma PLA₂ endógena do parasita (HENRIQUES et al., 2003).

Os tripomastigotas da corrente sanguínea são cobertos com uma camada densa de glicoproteína de superfície variante (VSG), a qual protege o parasita da lise pelo hospedeiro (CROSS et al., 1975). É relatado que durante a diferenciação das formas infecciosas do *T. cruzi*, as fosfolipases de membrana (PLA₁, PLA₂, PLC) atuam nas reações de remodelação necessárias para a transformação da membrana plasmática (BOWES et al., 1993; FLORIN-CHRISTENSEN et al., 1997; SALTO et al., 2003). Outros autores relataram atividade de fosfolipase A₁ e fosfolipase A₂ na membrana em epimastigotas, mas atuando apenas sobre fosfolipídios aniônicos como inositolfosfolipídeos e inositolfosfoceramidas (BERTELLO et al., 2000). Curiosamente, em ambos os estágios infecciosos, a atividade da PLA₁ em *Trypanosoma cruzi* na membrana são notavelmente maiores do que as detectadas nas frações organelétricas ou solúveis (BELAUNZARÁN et al., 2007).

Em *T. gondii* foi descrita uma PLA₂ com atividade aciltransferase denominada TgLCAT, com potencial de romper membranas. Após a sua secreção a enzima localiza-se na membrana plasmática do vículo parasitóforo do parasita. Os autores demonstraram que os parasitas TgLCAT suprimidos possuíam um crescimento prejudicado *in vitro*, reduzem a virulência em animais e exibem atrasos na saída das células hospedeiras. Parasitas que super-expressam TgLCAT mostraram maior virulência e saída mais rápida. Em conclusão, a PLA₂ influencia no resultado de uma infecção, presumivelmente facilitando a replicação e à saída, dependendo do estágio de desenvolvimento do parasita (PSZENNY et al., 2016).

Estes dados suportam nossa hipótese de que o reconhecimento de alvos em extratos de *T. gondii* e *L. (L.) amazonensis* e no ensaio de imunofluorescência por anticorpos anti-BnSP-7 IgY especificamente, pode ser atribuído às PLAs que estão presentes principalmente nas membranas desses parasitas.

4.8 – Anticorpos IgY anti-BnSP-7 possuem efeito citotóxico em *L. (L.) amazonensis* e *T. gondii*

Adicionalmente, avaliamos a citotoxicidade de anticorpos anti-BnSP-7 IgY nas formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* e taquizoítos de *T. gondii* pelo ensaio de MTT e azul de tripan respectivamente. O IgY anti-BnSP-7 diminuiu significativamente a viabilidade de promastigotas de *L. (L.) amazonensis* quando comparado ao controle ($p < 0,05$, Figura 19A). Curiosamente, este efeito não foi dependente da concentração, uma vez que anti-BnSP-7 IgY a 12,5 $\mu\text{g} / \text{mL}$ e 6,25 $\mu\text{g} / \text{mL}$ foram mais citotóxicos do que as outras concentrações testadas, mostrando citotoxicidade de 83% e 36% respectivamente ($p < 0,05$, Figura 19A).

Esses resultados demonstraram uma faixa de atuação ótima e nos encorajaram a investigar novas concentrações (20 a 5 $\mu\text{g} / \text{mL}$) próximas a essa concentração altamente eficaz. Observamos diferenças significativas de citotoxicidade entre o controle e todos os tratamentos com anti-BnSP-7 IgY ($p < 0,05$, Figura 19B). Nas concentrações de 15, 10 e 5 $\mu\text{g} / \text{mL}$ obtivemos 68%, 75% e 71% de citotoxicidade, respectivamente. Não observamos diferença estatística

entre essas concentrações, mas todas foram estatisticamente diferentes em relação a 20 µg / mL ($p < 0,05$).

Estes resultados sugerem que existe uma concentração ideal para causar um melhor efeito nas formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis*. No entanto, novos experimentos precisam ser realizados para compreender o mecanismo pelo qual esse efeito seletivo ocorre.

Após observar os resultados da citotoxicidade em *L. (L.) amazonensis*, foram selecionadas concentrações de 15, 12,5, 10 e 5 µg / mL para avaliar a citotoxicidade nos taquizoito de *T. gondii* por azul de tripan. Analisamos a contagem de parasitas não viáveis, que apresentavam um citoplasma escuro. Em todas as concentrações testadas, observamos um aumento nos parasitas não viáveis quando comparado ao controle (Figura 19C). A concentração de 12,5 µg / mL foi estatisticamente diferente das concentrações de 15 e 5 µg / mL, mas não diferiu da concentração de 10 µg / mL.

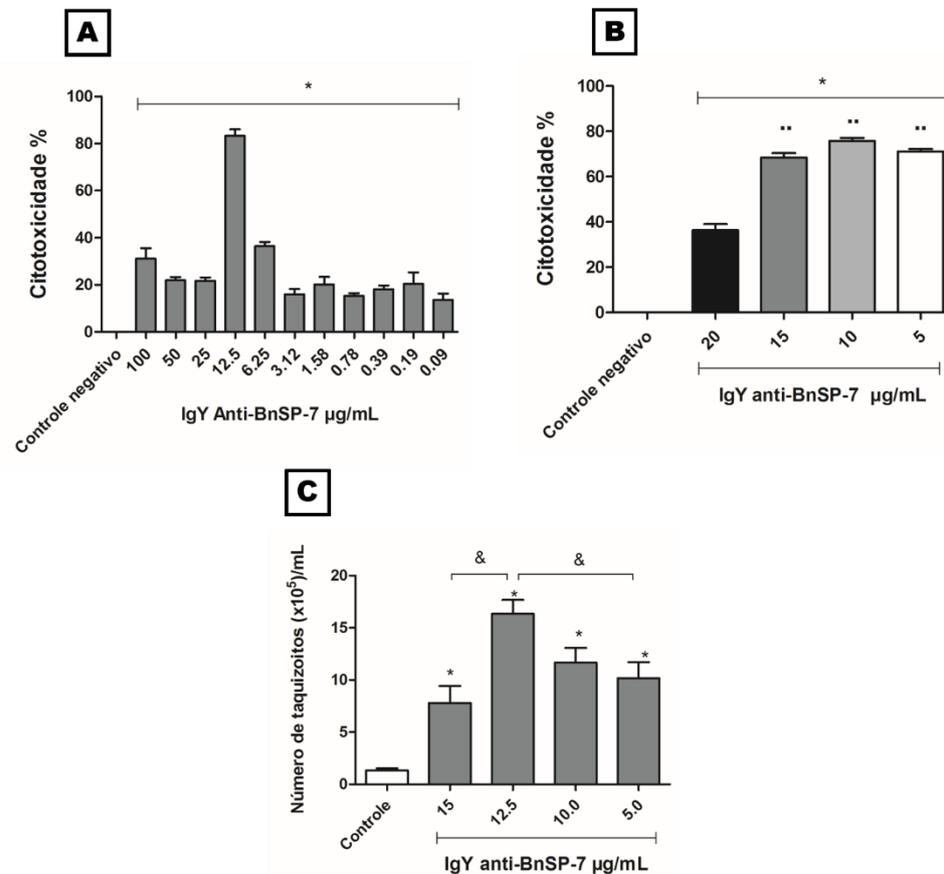


Figura 19: Efeito dos anticorpos IgY anti-BnSP-7 na citotoxicidade para formas promastigotas e taquizoitos de *L. (L.) amazonensis* e *T. gondii*, respectivamente. Meio com parasitas não tratados foram usados como um controle negativo para a morte celular. **(A)** - Ensaio de citotoxicidade promastigota de *L. (L.) amazonensis* com tratamentos IgY anti-BnSP-7 variando de 100 a 0,09 $\mu\text{g/mL}$. **(B)** - Ensaio de citotoxicidade promastigota de *L. (L.) amazonensis* com tratamentos IgY anti-BnSP-7 com ensaio de citotoxicidade de taquizoitos de 20, 15, 10 e 5 $\mu\text{g/mL}$. **(C)** - Ensaio de citotoxicidade em taquizoitos de *T. gondii* com IgY anti-BnSP-7 tratamentos 15, 12,5, 10 e 5 $\mu\text{g/mL}$. (*) Diferenças significativas entre o controle negativo e tratamentos com anti-BnSP-7 IgY ($p < 0,05$; ANOVA) (&). Diferenças significativas entre concentração de 12,5 $\mu\text{g/mL}$ e concentrações de 15 e 5 $\mu\text{g/mL}$. (**) Diferenças significativas entre concentração de 20 $\mu\text{g/mL}$ versus 15, 10 e 5 $\mu\text{g/mL}$ ($p < 0,05$; ANOVA).

Em tripanossomatídeos, as fosfolipase A₂ desempenham um papel vital na invasão de células hospedeiras, no influxo de Ca²⁺ e durante a remodelação lipídica (OPPERDOES e ROY, 1982; BELAUNZARÁN et al., 2011). Portanto, os anticorpos IgY anti-BnSP-7 nas concentrações ótimas testadas devem afetar a fisiologia da *L. (L.) amazonensis*, impactando, assim, sua sobrevivência em cultura.

Bordon e colaboradores (2018) avaliaram a eficácia de inibidores da PLA₂ citosólica e secretada, como lactona de bromoenol (BEL), fluorofosfonato de araquidonilmetila (MAFP) e ácido aristolóquico (AA) na viabilidade de formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis*. Os autores mostraram que os inibidores foram efetivos causando citotoxicidade em formas promastigotas e podem afetar a sobrevivência de amastigotas intracelulares de *L. (L.) amazonensis*, sugerindo que diferentes famílias de enzimas PLA₂ não só desempenham algum papel durante a infecção, mas também podem ser importantes para a sobrevivência intracelular das formas amastigotas. A morte celular foi mais sensível ao inibidor BEL em comparação com os outros inibidores, e por isso, acredita-se que as PLA_{2s} independente de Ca²⁺ pode conter significância biológica vital para a sobrevivência de parasitas.

É provável que epítomos de reconhecimento dos anticorpos anti-BnSP-7 contemplem regiões/domínios em comum com diferentes classes de PLA de parasitos contribuindo para os efeitos observados que estão de acordo com dados apresentados na literatura. Moléculas capazes de inibir estas enzimas podem ser consideradas valiosos protótipos para o desenho de drogas.

4.9 – Anticorpos IgY anti-BnSP-7 inibem a proliferação de formas promastigotas e taquizoitos de *L. (L.) amazonensis* e *T. gondii*, respectivamente

Após a verificação da viabilidade significativamente diminuída de *T. gondii* e *L. (L.) amazonensis* pelos IgY anti-BnSP-7, investigamos também os efeitos desses anticorpos na proliferação. Em *L. (L.) amazonensis* foi realizado uma curva de crescimento de 0h a 96h e para *T. gondii* foi realizado o ensaio colorimétrico utilizando uma cepa modificada β-galactosidase.

Para ambos os parasitas, as concentrações de 12,5 e 10,0 $\mu\text{g} / \text{mL}$ mostraram-se mais eficazes nos ensaios de citotoxicidade; portanto, essas concentrações foram selecionadas para os ensaios de proliferação. A partir de 48 h, uma redução significativa no crescimento de *L. (L.) amazonensis* foi observada em todas as concentrações testadas. No entanto, não houve diferença significativa entre eles (Figura 20A). Às 96 h, a concentração de 10,0 $\mu\text{g} / \text{mL}$ mostrou-se significativamente melhor que a de 12,5 $\mu\text{g} / \text{mL}$ para reduzir o crescimento das formas promastigotas ($p < 0,05$).

O IgY anti-BnSP-7 também foi capaz de diminuir a proliferação intracelular de *T. gondii* a 12,5 $\mu\text{g} / \text{mL}$ quando comparado a parasitas não tratados, conforme avaliado pela medida da β -galactosidase ($p < 0,05$) (Figura 20B). Não houve diferença significativa a 10,0 $\mu\text{g} / \text{mL}$.

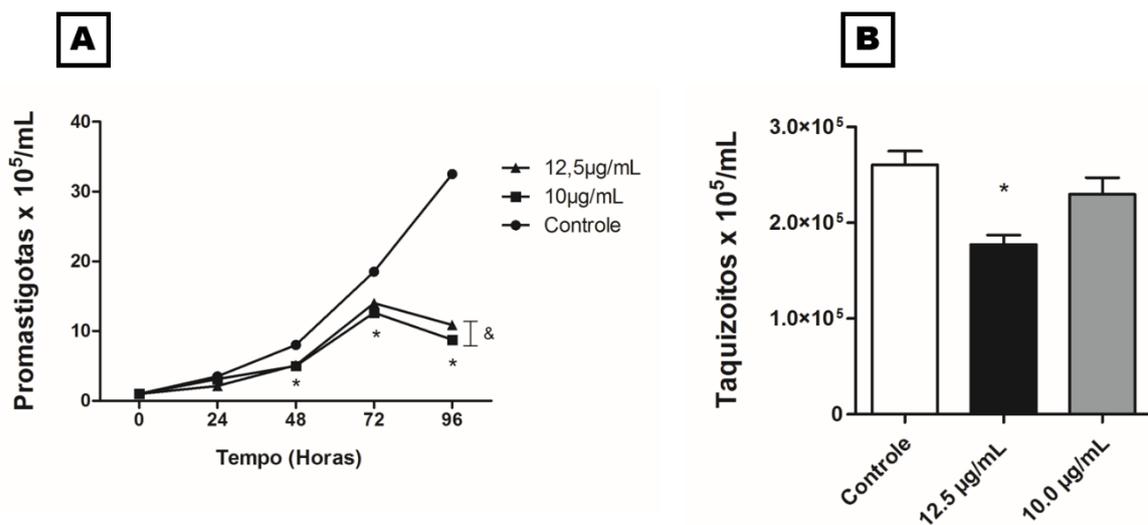


Figura 20: Efeitos do IgY anti-BnSP-7 no ensaio de proliferação de *L. (L.) amazonensis* e *T. gondii*. Parasitos tratados apenas com meio foram utilizados como controle. **(A)** - Ensaio antiproliferativo em *L. (L.) amazonensis* com tratamentos IgY anti-BnSP-7 a 12,5 e 10 $\mu\text{g} / \text{mL}$. **(B)** - Ensaio de proliferação por β -galactosidase na medição de *T. gondii* 24 h após a infecção. (*) Diferenças significativas entre o controle e os tratamentos com IgY anti-BnSP-7 ($p < 0,05$; ANOVA) (&) diferenças significativas entre as concentrações de 12,5 $\mu\text{g} / \text{mL}$ e 10,0 $\mu\text{g} / \text{mL}$.

Conforme já discutido, a secreção das PLAs é aumentada em formas parasitárias associadas a estágios infecciosos e desempenham um papel vital para a sobrevivência de parasitas (HAMBREY et al., 1981; WAINSZELBAUM et al., 2001). A significativa redução da viabilidade causada pelos IgY anti-BnSP-7 nas concentrações de 12,0 e 10,0 µg / mL possivelmente altera a constituição de moléculas essenciais e, portanto, não permitem que o parasita prolifere.

4.10 – *L. (L.) amazonensis* previamente tratada com IgY anti-BnSP-7 reduz sua invasão em macrófagos da medula óssea.

Como os efeitos antiparasitários se mostraram mais eficazes em *L. (L.) amazonensis*, realizamos o ensaio de invasão celular utilizando apenas essa espécie. Portanto, o primeiro passo foi avaliar a citotoxicidade dos anticorpos IgY anti-BnSP-7 em macrófagos (MDMO), utilizando as concentrações que se mostraram mais eficazes nos ensaios de citotoxicidade e anti-proliferativo (12,5 e 10,0 µg / mL).

Em ambas as concentrações não houve redução significativa na viabilidade de macrófagos MDMO (Figura 21), comprovando que os IgY anti-BnSP-7 seriam uma ferramenta promissora para a investigação na patogênese da invasão células por *L. (L.) amazonensis*.

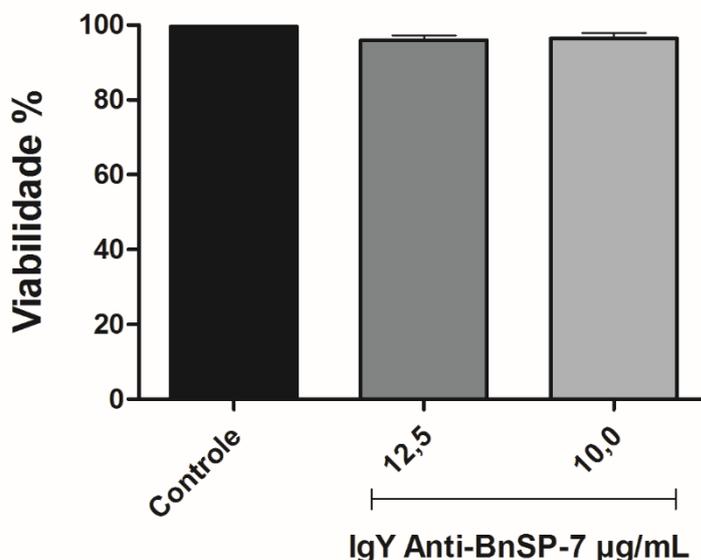


Figura 21: Efeitos do IgY anti-BnSP-7 na viabilidade em macrófagos MDMO. Meio com células não tratadas foram usadas como um controle negativo para a morte celular.

Para a investigação do ensaio anti-invasivo, duas abordagens foram realizadas na análise dos resultados: o número de células com parasitos invadidos e o número total de parasitos invadidos. Quando as formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* foram tratadas antes da interação com as células MDMO, a invasão desses parasitas foi significativamente ($p < 0,05$) reduzida nas concentrações de 12,5 e 10,0 $\mu\text{g/mL}$ quando comparada aos parasitas não tratados (Figura 22B). O número de células infectadas também foi significativamente ($p < 0,05$) menor quando comparado ao controle (Figura 22A).

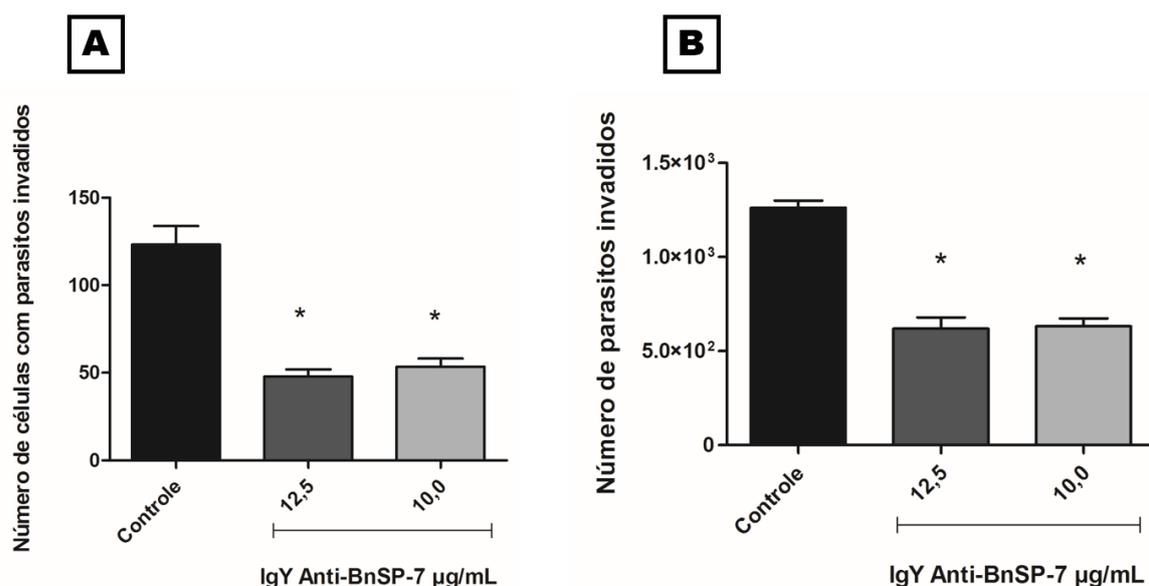


Figura 22: Efeitos dos anticorpos IgY anti-BnSP-7 na invasão de de *L. (L.) amazonensis* após o tratamento de promastigotas com IgY anti-BnSP-7 por 2 horas antes da infecção do parasita. Promastigotas tratados apenas com LIT foram definidos como controle. Este ensaio foi avaliado de acordo com o número de células MDMO com parasitas invadidos **(A)** Número total de células com promastigotas invadidos. **(B)** Número total de parasitas invadidos. (*) Diferenças significativas entre o controle e os tratamentos com IgY anti-BnSP-7 ($p < 0,05$; ANOVA).

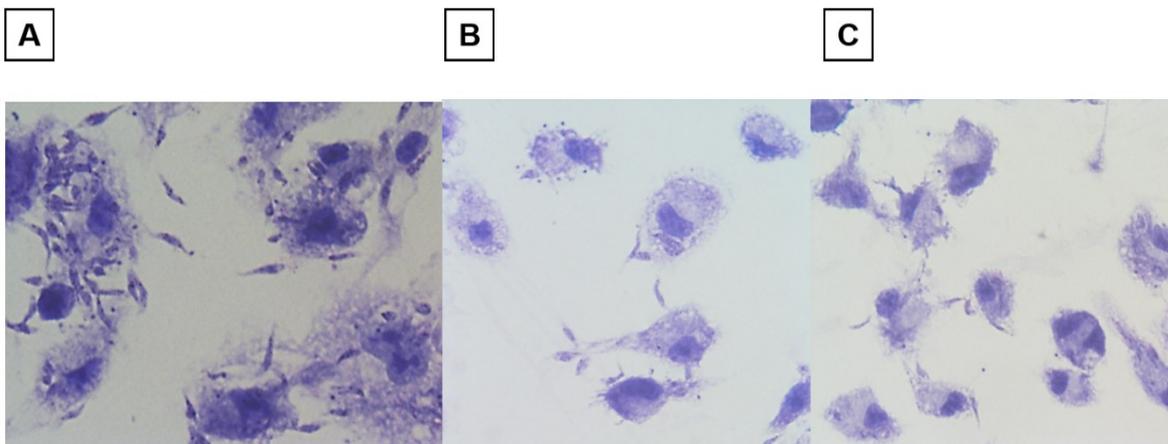


Figura 23: Efeitos dos anticorpos IgY anti-BnSP-7 na invasão de *de L. (L.) amazonensis* após o tratamento de promastigotas com IgY anti-BnSP-7 por 2 horas antes da infecção do parasita. Promastigotas tratados apenas com LIT foram definidos como controle. Este ensaio foi avaliado de acordo com o número de células MDMO com parasitas invadidos **(A)** Controle **(B)** Tratamento de promastigotas com IgY anti-BnSP-7 12,5 µg/mL **(C)** Tratamento de promastigotas com IgY anti-BnSP-7 10,0 µg/mL.

Outro papel atribuído as PLAs em diferentes microrganismos tem sido associado à patogênese, onde este efeito pode estar relacionado à capacidade de destruir fosfolipídios de membrana (ISTIVAN e COLOE, 2006; BOS et al., 2005). Estas evidências especialmente estão aumentando em relação a organismos da classe dos tripanossomatídeos (BELAUNZARÁN et al., 2011), como espécies do gênero *Leishmania* e em protozoários patogênicos. A ação das fosfolipases tem sido implicada na invasão celular (GONZÁLEZ-GARZA et al., 2000; SAFFER e SCHWARTZMAN, 1991; PASSERO et al., 2008).

Henriques e colaboradores (2003), analisaram a composição de fosfolipídios de macrófagos, infectados ou não com *Leishmania*. Os principais fosfolipídios encontrados na membrana plasmática de macrófagos foram fosfatidilcolina e fosfatidiletanolamina, com níveis crescentes de lisofosfatidilcolina após a infecção. A lisofosfatidilcolina é produto da clivagem da fosfatidilcolina pela fosfolipase A₂, portanto, o aumento nos seus níveis pode refletir, indiretamente, a ação da fosfolipase A₂ endógena / parasitária sobre a fosfatidilcolina de macrófagos. Em *T. gondii* foi descrito que a inibição da fosfolipase A₂ protegia as células monocíticas humanas da invasão do parasita (GOMEZ-MARÍN et al., 2002).

Para a melhor compreensão do papel das enzimas durante a invasão dos parasitas em células de hospedeiros, diversos estudos focaram no uso de inibidores de PLAs (SHUAIBU et al., 2001; LUJAN e BRONIA, 1994; EINTRACHT et al., 1998). Pollock e colaboradores (2003) demonstraram que o tratamento de *Cryptosporidium parvum* com inibidor irreversível de PLA p-BPB foi capaz de inibir significativamente a infecção em enterócitos humanos. Mas os autores não observaram qualquer inibição da infecção quando estas células foram pré-tratadas com o inibidor de PLA e subsequentemente infectadas com os parasitas não tratados, sugerindo que o inibidor mediava a sua ação no parasita. Assim como no presente trabalho, o mesmo grupo demonstrou que os anticorpos anti-PLA₂ desenvolvidos contra a PLA₂ de peçonha de abelha foram capazes de inibir significativamente a infecção por *C. parvum* em células hospedeiras.

Um estudo em *L. major* observou a virulência de cepas de promastigotas mutantes que não produziam uma PLA₂/PAF-AH e cepas selvagens em camundongos BALB/c. Os resultados mostraram que camundongos infectados por parasitas selvagens desenvolveram lesões que cresceram rapidamente em tamanho, em comparação com camundongos infectados por parasitas PLA₂ / PAF-AH suprimidos, que mostraram um atraso significativo no desenvolvimento da lesão. O tamanho das lesões mostrou uma correlação positiva com o número de parasitas nas patas infectadas. Esses dados sugerem que a PLA₂/PAF-AH é um fator importante na infecção (PAWLOWIC e ZHANG, 2012).

Considerando que as fosfolipases estão presentes nos parasitas e hospedeiros mamíferos, é relevante o conhecimento de suas estruturas tridimensionais para determinar as diferenças/semelhanças entre elas. Isso permitiria o desenho de inibidores específicos que poderiam ser empregados como potenciais drogas anti-parasitárias nas doenças causadas por tripanossomatídeos. Nesse sentido, os anticorpos IgY anti-BnSP-7 se mostram uma ferramenta promissora, uma vez que sua ação é seletiva, possuindo efeitos apenas sobre parasitas e não sobre células.

A toxicidade das PLAs, além de clivar fosfolipídios de membranas e estar relacionada com a invasão, está correlacionada com liberação de produtos que agem como segundo mensageiros, como prostaglandinas, tromboxanos, dentre

outros. Vários componentes parasitários são importantes durante o processo de fagocitose, assim como na sobrevivência intracelular dos parasitos de Leishmania.

A esse respeito, Passero e colaboradores (2008) demonstraram que o sobrenadante de *L. (L.) amazonensis* apresentou atividade fosfolipase A₂ (PLA₂), e quando uma fonte adicional de fosfolipase A₂ foi adicionada em cultura, a via de produção de eicosanóides foi estimulada e prostaglandina E₂ (PGE₂) foi produzida em níveis elevados; esse evento foi associado ao aumento do número de amastigotas intracelulares. Estes resultados sugerem o envolvimento de PLA₂ na via de produção de prostaglandinas, e que esta via pode ser considerada um mecanismo adicional pelo qual os parasitos da *L. (L.) amazonensis* infectam, modulam a inflamação e persistem no hospedeiro. A infecção de células hospedeiras por *L. donovani* induziu a expressão de COX-2 favorecendo a infecção e que quando as células são tratadas com inibidores de COX-2 e infectadas com *L. major* apresentaram menor número de amastigotas intracelulares e redução da liberação de PGE₂ (ARCANJO et al., 2015; BHATTACHARJEE et al., 2016). Foi demonstrado que este mediador lipídico é aumentado após 1-2 h de infecção por Leishmania e pode exacerbar a infecção (HENRIQUES et al., 2003).

Células infectadas por *T. gondii* também aumentaram a expressão de COX-2 e PGE₂ e esse último está correlacionado a maior susceptibilidade à infecção pelo parasita (GOMES et al., 2014; BARBOSA et al., 2014). Nesse sentido, foi demonstrado que células de microglia de camundongos (células BV-2) infectadas com cepas RH ou ME49 modificaram significativamente a expressão de COX-2 para controlar a infecção (HWANG et al., 2018).

Pereira e colaboradores (2019) investigaram o papel da COX-2 durante a infecção por cepas moderadamente ou altamente virulentas de *T. gondii* em roedores *Calomys callosus* e células humanas THP-1. Os resultados mostraram que os animais tratados com inibidores de COX-2 apresentaram redução do parasitismo tecidual e menor morbidade em comparação aos animais não tratados. O mesmo perfil se manteve *in vitro* uma vez que macrófagos peritoneais e células THP-1 infectadas com *T. gondii* e tratadas com os inibidores também reduziram significativamente a carga parasitária. Os autores também observaram o restabelecimento do crescimento de *T. gondii* células THP-1 bloqueadas para COX-

2 e tratadas com PGE₂, concluindo que o papel da COX-2 durante a infecção por *T. gondii* é dependente de PGE₂.

Borges e colaboradores (2016) demonstraram que a PLA₂ BnSP-7, utilizada na produção dos anticorpos IgY do presente estudo, também interferiu nos processos de adesão e na proliferação de *T. gondii* em células Hela, com um aumento na produção das citocinas pró-inflamatórias MIF e IL-6, as quais são importantes no controle do parasitismo intracelular (JEBBARI et al. 1998). Tais dados sugerem que a toxina BnSP-7 também é uma ferramenta importante para a descoberta de novos alvos de parasitas que podem ser explorados para desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento da toxoplasmose.

4.10 – Construção do Bioeletrodo e imobilização dos anticorpos IgY

Após a avaliação do potencial antiparasitário dos anticorpos IgY anti-BnSP-7, investigamos a sua aplicabilidade na detecção de alvos presentes dos extratos parasitários através da construção de um bioeletrodo. Anticorpos obtidos tanto pela imunização com a proteína alvo BnSP-7 como por imunização apenas com PBS (grupo controle) foram utilizados, com o intuito de validar o presente trabalho, pelo reconhecimento do alvo específico (fosfolipase A₂).

A Figura 23A apresenta os histograma de onda quadrada representativos da superfície do eletrodo modificado na presença e na ausência das biomoléculas sondas (anticorpos), na presença da sonda redox ferro/ferricianeto de potássio (K₄[Fe(CN)₆]/K₃[Fe(CN)₆].3H₂O, 5 mmol/L, contendo 0.1 mol/L de KCl). A voltametria de onda quadrada foi realizada numa janela de potencial de -0.1 V a +0.6 V vs. Ag/AgCl, frequência de 15 Hz e amplitude de 25 mV.

Já a figura 23B apresenta um voltamograma que representa a média e desvio padrão dos dados de corrente obtidos das triplicatas de cada análise. Observa-se que na ausência de biomoléculas, ou seja, apenas no eletrodo de grafite (EG) com o nanocompósito, a corrente do pico de oxidação resultante é maior, porém ao imobilizar os anticorpos a corrente cai em aproximadamente 350 µA. Esta redução é devido a presença da camada proteica de anticorpos, que atua como um bloqueio físico aos íons carregados, impedindo que cheguem à superfície,

dessa forma há um decaimento de corrente com a imobilização da sonda. Estes dados indicam que a imobilização por adsorção foi efetiva.

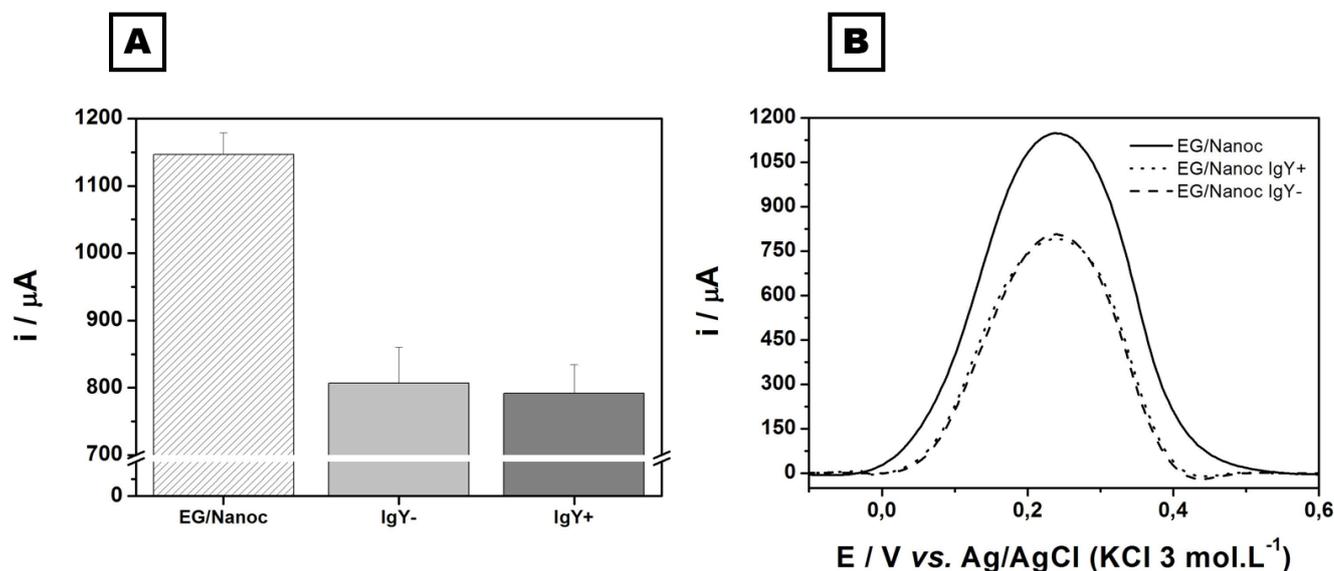


Figura 23: Voltamogramas da superfície do eletrodo modificado na presença e na ausência das biomoléculas sondas (anticorpos), na presença da sonda redox ferro/ferricianeto de potássio ($K_4[Fe(CN)_6]/K_3[Fe(CN)_6].3H_2O$). **A** - Histograma dos dados de corrente; **B** - Voltamogramas de onda quadrada. EG/nanoc representa o bioeletrodo de grafite com o nanocompósito, IgY- representa o imunossensor imobilizado com anticorpos IgY imunizados com PBS e IgY+ representa o imunossensor imobilizado com os anticorpos anti-BnSP-7.

Os materiais comumente usados na construção de bioeletrodos incluem ouro, platina, diamante dopado com boro e carbono (IOST et al., 2011). Os eletrodos de grafite, apresentam vantagens como baixo custo, versatilidade e ampla gama de trabalho (SILVA et al., 2009), podendo ser modificados com filmes poliméricos para aumentar sua reprodutibilidade, promover interações redox e a imobilização de biomoléculas (RODRIGUES et al., 2014). Uma ampla variedade de nanomateriais, tais como nanotubos de carbono, grafeno e polímeros, tem sido extensivamente estudada como um material intermediário entre o elemento de reconhecimento biológico e as superfícies dos eletrodos em um esforço para realizar biossensores de superfície altamente sensíveis e seletivos (ZHU et al., 2015; WANG et al., 2015; BARSAN et al., 2015).

O grafeno e seus derivados têm recebido atenção crescente nos campos biomédicos devido às suas propriedades físico-químicas únicas, como alta área de superfície, excelente condutividade elétrica, forte resistência mecânica, condutividade térmica incomparável e facilidade de funcionalização da superfície (BALANDIN et al., 2008; WEISS et al., 2012; GEORGAKILAS et al., 2012). Além disso, sabe-se que seus derivados de óxido de grafeno possuem grupos funcionais como epóxidos, hidroxilas, carbonila e carboxila (FERREIRA et al., 2011; LIU et al., 2015; LAWAL et al., 2015; DONG et al., 2017), promovendo um ambiente adequado para acomodar as biomoléculas e facilitando a transferência de elétrons para a superfície dos eletrodos. Além disso, a imobilização de biomoléculas pode ser melhorada, uma vez que diversos materiais podem ser funcionalizados com seus grupos funcionais, visando à preparação de eletrodos (SILVA et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2010).

De acordo com as propriedades físico-químicas únicas acima mencionadas o grafeno e seus derivados (óxido de grafeno e óxido de grafeno reduzido) são os nanomateriais bem aceitos para a fabricação de biossensores eletroquímicos, melhorando propriedades como área de superfície, amplificação de sinal, sensibilidade, condutividade, seletividade e estabilidade (IOST et al., 2011; KUILA et al., 2012; SONG et al., 2016; BOLLELLA et al., 2017; LEE et al., 2019).

Uma vasta gama de biomoléculas é comumente utilizada como elemento de reconhecimento biológico para a construção de biossensores, tais como, enzimas (BATRA et al., 2014), anticorpos (HENNESSEY et al., 2009), ácidos nucleicos (SILVA et al., 2009), e peptídeos (GÓMARA et al., 2000; LI et al., 2013), cada um com suas próprias vantagens na detecção do analito alvo. Os anticorpos têm sido considerados potenciais analitos ou ligantes para ensaios de detecção e são bastante explorados no desenvolvimento de biossensores, devido as suas especificidades, como a forte afinidade pelo antígeno (WANG et al., 2008; CONROY et al., 2009).

Os imunossensores são biossensores que monitoram a interação antígeno-anticorpo, nos quais o anticorpo ou o antígeno são imobilizados sobre a superfície do transdutor (RICCI et al., 2012; WAN et al., 2013). O sucesso de um imunossensor depende de vários fatores, incluindo a funcionalização da superfície,

a orientação dos anticorpos, a densidade dos anticorpos sobre a plataforma do sensor e a configuração do imunossensor (GOPINATH et al., 2014).

A orientação dos anticorpos é um passo extremamente importante para o sucesso do imunossensor, pois dependendo do processo de imobilização e da porção que é imobilizada da imunoglobulina, pode dificultar a interação como antígeno. Neste sentido, duas abordagens que podem ser utilizadas na preparação da superfície do sensor: aleatória e sítio-dirigida ao local de imobilização do anticorpo (SANTANA et al., 2016). A imobilização orientada (sítio-dirigida), imobiliza a porção Fc do anticorpo na superfície do sensor, expondo o parátipo presente na porção Fab. Deste modo, assegura a minimização de impedimento estérico e, conseqüentemente, facilita a interação antígeno-anticorpo, aumentando a sensibilidade da análise (PIETRO-SIMÓN et al., 2015).

Muitos pesquisadores se concentraram em modificar o grafeno e seus derivados na superfície do eletrodo com vários materiais para obter um melhor desempenho no sensor eletroquímico (TIWARI et al., 2015). A poli(tiramina) é um filme polimérico que possui um grupamento amino livre em cada monômero, resultante em uma grande quantidade de sítios ativos que são utilizados para imobilização de biomoléculas via ligação covalente. Portanto, no presente trabalho foi utilizado o nanocomposito de óxido de grafeno reduzido com o filme polimérico de poli(tiramina) (metodologia descrita em BR1020160291089), para a imobilização dos anticorpos IgY anti-BnSP-7 pela presença dos grupos amino livre que se ligam com os grupos carboxi-terminal na porção Fc, promovendo a orientação que facilita a interação antígeno-anticorpo, além de aumentar a área superficial e a condutividade dos eletrodos.

As imunorreações nos transdutores eletroquímicos podem causar alterações de potencial, corrente, concentração de íons, condutância, capacitância ou impedância (TIMOTHY et al., 2012). Para detectar a interação entre a biomolécula imobilizada e o analito, moléculas redox externas podem ser usadas, como o ferrocianeto, que tem um pico de oxidação bem definido e pode discriminar diferentes camadas ou amostras na superfície do eletrodo (RESENDE et al., 2018; OLIVEIRA et al., 2019). No presente trabalho demonstramos que na presença da sonda redox ferro/ferricianeto de potássio obtivemos uma diferença significativa

entre o eletrodo de grafite com o nanocompósito livre e com os anticorpos anti-BnSP-7 imobilizados.

4.11 – O imunossensor é capaz de reconhecer a proteína alvo BnSP-7

A fim de validar os dados obtidos no ensaio de ELISA, avaliamos o reconhecimento dos imunossensores imobilizados com os anticorpos IgY anti-BnSP-7 ou com anticorpos IgY imunizados com PBS, no reconhecimento da fosfolipase A₂ BnSP-7.

A FIGURA 24A apresenta os voltamogramas de onda quadrada representativos da superfície do eletrodo modificado com apenas a sonda positiva (anticorpos obtidos pela imunização com a BnSP-7), sonda negativa (anticorpos obtidos após imunização com PBS), e após a incubação de ambas com o alvo purificado (fosfolipase A₂), na presença da sonda redox ferro/ferricianeto de potássio ($K_4[Fe(CN)_6]/K_3[Fe(CN)_6].3H_2O$, 5 mmol/L, contendo 0.1 mol/L de KCl). A voltametria de onda quadrada foi realizada numa janela de potencial de -0.1 V a +0.6 V vs. Ag/AgCl, frequência de 15 Hz e amplitude de 25 mV.

Já a FIGURA 24B apresenta um histograma que representa a média e desvio padrão dos dados de corrente obtidos das triplicatas de cada análise. Observa-se que a corrente do pico de oxidação resultante foi constante na presença das duas sondas, e manteve-se praticamente inalterada quando o eletrodo com anticorpo obtido por contato com PBS foi exposto à proteína alvo. Essa manutenção da corrente evidencia que não houve interação da sonda com o alvo, pois o mesmo é removido na etapa de lavagem caso não ocorra a interação com a superfície. Já na presença dos anticorpos IgY anti-BnSP-7 observa-se um decaimento em média de 200 μA na corrente, mostrando que o alvo interagiu com o bioeletrodo, formando uma camada proteica adicional e diminuindo o contato dos íons ferro/ferricianeto com a superfície do eletrodo. Estes dados demonstram a especificidade do anticorpo obtido para com o alvo (fosfolipase A₂).

Os dados obtidos estão de acordo com os resultados obtidos no ELISA demonstrando a especificidade dos anticorpos anti-BnSP-7 frente ao reconhecimento de fosfolipases A₂.

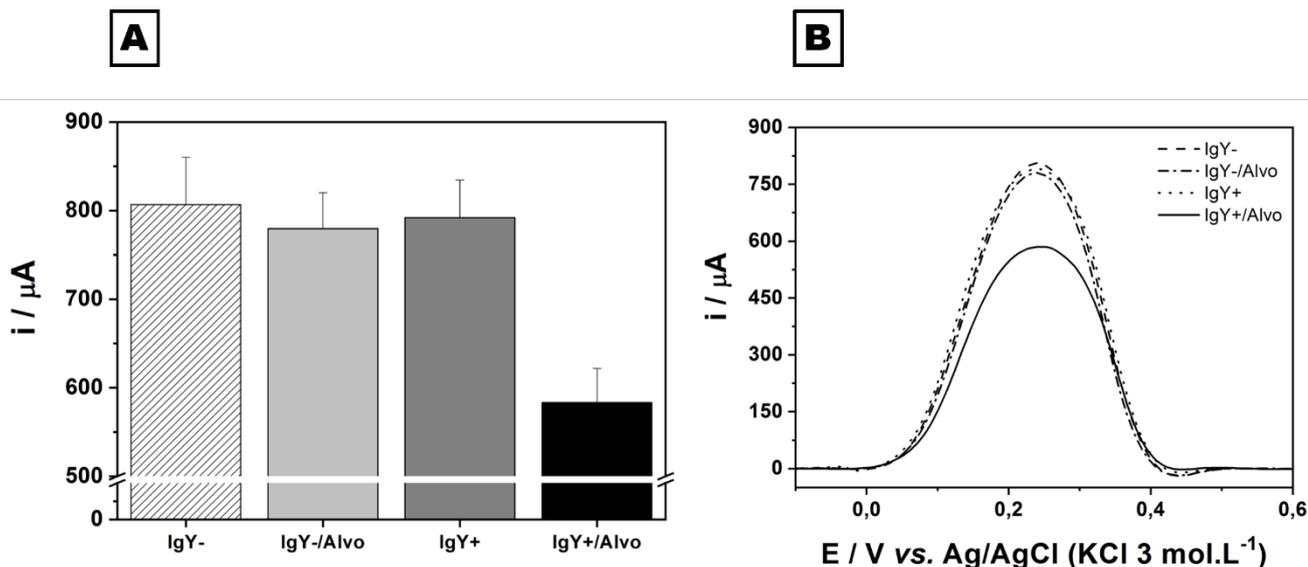


Figura 24: Voltamogramas da superfície do eletrodo modificado na presença e na ausência das biomoléculas sondas (anticorpos anti-BnSP-7 e PBS), na presença da sonda redox ferro/ferricianeto de potássio ($K_4[Fe(CN)_6]/K_3[Fe(CN)_6].3H_2O$). **A** - Histograma dos dados de corrente; **B** - Voltamogramas de onda quadrada. IgY- representa o imunossensor imobilizado com anticorpos IgY imunizados com PBS; IgY-/Alvo representa o imunossensor imobilizado com anticorpos IgY imunizados com PBS com a proteína alvo BnSP-7; IgY+ representa o imunossensor imobilizado com os anticorpos anti-BnSP-7 e IgY+/Alvo representa o imunossensor imobilizado com os anticorpos anti-BnSP-7 com a proteína alvo BnSP-7.

4.12 – Imunossensor imobilizado com anticorpos anti-BnSP-7 detectam alvos em extratos de *L. (L.) amazonensis*

Após a caracterização do imunossensor imobilizados com anticorpos anti-BnSP-7, verificamos sua eficácia na detecção de alvos nos extratos de *L. (L.) amazonensis*.

A figura 25A apresenta os histograma de onda quadrada representativos da superfície do eletrodo modificado com a sonda positiva (anticorpos obtidos pela imunização com a BnSP-7), após a incubação com o extrato de células mononucleares de sangue periférico saudável (PBMC) e com o extrato de *L. (L.) amazonensis*, na presença da sonda redox ferro/ferricianeto de potássio ($K_4[Fe(CN)_6]/K_3[Fe(CN)_6].3H_2O$, 5 mmol/L, contendo 0.1 mol/L de KCl). A

voltametria de onda quadrada foi realizada numa janela de potencial de -0.1 V a +0.6 V vs. Ag/AgCl, frequência de 15 Hz e amplitude de 25 mV.

Já a figura 25B apresenta um voltamograma que representa a média e desvio padrão dos dados de corrente obtidos das triplicatas de cada análise. Observa-se que a adição do extrato de PBMC não resultou numa alteração significativa da corrente, demonstrando que seus componentes foram removidos com a lavagem do eletrodo. Já com a adição do extrato de *L. (L.) amazonensis* houve um decaimento médio da corrente do pico de oxidação resultante de 125 μA , indicando que proteínas ficaram adsorvidas no eletrodo e por impedimento estérico não permitiram a passagem de uma parte dos íons do par redox ferro/ferricianeto para a superfície do eletrodo.

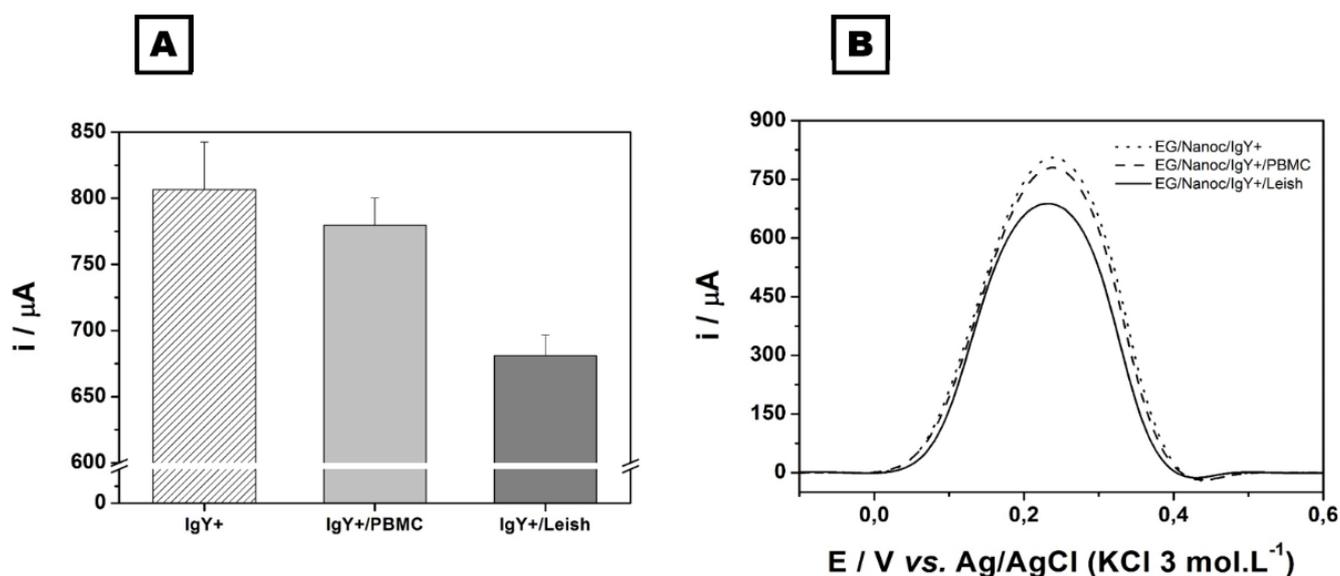


Figura 25: Voltamogramas da superfície do eletrodo modificado na presença e na ausência das biomoléculas sondas (anticorpos anti-BnSP-7 e PBS), na presença da sonda redox ferro/ferricianeto de potássio ($\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$). **A** - Histograma dos dados de corrente; **B** - Voltamogramas de onda quadrada. IgY+ representa o imunossensor imobilizado com os anticorpos anti-BnSP-7; IgY+/PBMC representa o imunossensor imobilizado com os anticorpos anti-BnSP-7 e o extrato de células mononucleares do sangue e IgY+/Leish representa o imunossensor imobilizado com os anticorpos anti-BnSP-7 e o extrato de *L. (L.) amazonensis*.

Os parasitas de gênero *Leishmania* desenvolveram mecanismos de defesa capazes de sobreviverem ao ataque do sistema imunológico, multiplicar-se até a

ruptura da célula para infectar outros macrófagos, propagando a infecção. Desse modo em algumas infecções, a doença pode não manifestar sintomas durante um período, que pode ser de dois a três meses ou anos. Pacientes com doença assintomática geralmente apresentam baixos títulos de anticorpos, dificultando a detecção da doença com técnicas padronizadas (FURTADO,1994).

Várias rotas de diagnóstico laboratorial foram estabelecidas para a leishmaniose (SUNDAR et al., 2002; CABRAL-MIRANDA et al., 2014), porém elas necessitam de profissionais experientes para a análise, são realizados exclusivamente em laboratórios ou hospitais bem equipados, com instrumentações avançadas, pré-tratamento de amostra complicado e longos períodos de análise (LIEBANA et al., 2016). Além disso, essas técnicas não são capazes de detectar a infecção na sua fase inicial, uma vez que em muitos pacientes não se desenvolve uma significativa resposta imunológica devido aos mecanismos de escape do sistema imune.

Neste cenário, um ponto importante a se considerar é a necessidade de novos métodos e materiais que possibilitem um diagnóstico precoce e que seja barato, rápido e eficiente, para a detecção de patógenos (RAHI et al., 2015; VARADI et al., 2017; MOHAMMADI et al., 2017). As PLA₂s presentes em organismos eucarióticos e procarióticos são descritas como participantes de vários processos celulares, como invasão e penetração em células hospedeiras. Essas características proeminentes explicam o interesse dessas enzimas como potenciais alvos que poderiam contribuir para o diagnóstico precoce.

Os biosensores oferecem várias vantagens sobre as técnicas analíticas convencionais, incluindo dispositivos de diagnóstico de pronto atendimento, não necessitam de manuseio profissional, portabilidade, miniaturização e monitoramento no local, bem como boa seletividade (ou especificidade) e sensibilidade, dependendo do transdutor (CASTRO, et al., 2014; RAHI et al., 2016; HELI et al., 2017; MOHAMMADI et al., 2017; FELIX et al., 2018). São ferramentas adequadas para diferentes aplicações (MERCANTE et al., 2017; GAUDIN, 2017; HAMEED et al., 2018), incluindo diagnóstico de doenças (ROCHA-GASO et al., 2017; MITTAL et al., 2017; PARTHASARATHY e VIVEKANANDAN, 2018).

Já foram relatados inúmeros dispositivos com definição de imunossensores (AYDIN et al., 2017; DINIZ et al., 2003), que têm por finalidade propiciar maior

especificidade em diagnósticos diversos (SANTANA et al., 2016), e representam um ótimo sistema para a detecção de soro positivo (CORDEIRO et al., 2019) por combinar as vantagens de boa sensibilidade e alta seletividade. Além disso, eles permitem que o progresso das imunorreações nas superfícies dos detectores seja seguido em tempo real (FELIX et al., 2018). Neste sentido, ovos de galinha imunizados com diferentes antígenos representam uma excelente fonte de anticorpos IgY policlonais, que têm sido amplamente utilizados como uma ferramenta biotecnológica para imunoterapia e aplicação diagnóstica (PEREIRA et al., 2019; ŁUPICKA-SŁOWIK et al., 2019).

Detectar e monitorar os patógenos com alta seletividade e sensibilidade é fundamental para a saúde pública (HELI et al., 2016; MOHAMMADI et al., 2017; Santos-de-Souza et al., 2019). Neste aspecto, a leishmaniose por ser uma doença com alto impacto na saúde pública em muitos países, diversos trabalhos vêm demonstrando o desenvolvimento de sensores para o estudo e aprimoramento do diagnóstico em leishmaniose (SOUTO et al., 2013; SATTARAHMADY et al., 2016; NETO et al., 2018).

Nazari-Vanani e colaboradores (2018) projetaram e desenvolveram um sensor de DNA com base na hibridização de um DNA de fita simples de *L. Infantum* imobilizado nas nanoestruturas de ouro e azul de toluidina como indicador redox, para a detecção sensível do genoma de *Leishmania infantum*. O sensor possui capacidade de discriminar a sequência alvo de sequências incompatíveis, com boa reprodutibilidade e estabilidade durante repetidos ciclos de regeneração e hibridação. Também foi desenvolvido um imunossensor de impedância eletroquímica livre de rótulo, utilizando-se antígenos solúveis de *L. infantum* imobilizados em eletrodos impressos em tela para a detecção de anticorpos anti-*Leishmania infantum*. O imunossensor apresentou sensibilidade, especificidade uma vez que as amostras reais (soros canino e humano positivo e negativo) testadas tiveram diferenças significativas (CORDEIRO et al., 2019).

Pela primeira vez, relatamos o desenvolvimento de um imunossensor com anticorpos IgY anti-BnSP-7 imobilizados em um eletrodo de grafite com nanocompósito de óxido de grafeno reduzido com filme polimérico de poli(tiramina), usando ferrocianeto, como indicador de interação antígeno-anticorpo, em extratos de *L. (L.) amazonensis* e células do sangue periférico humano, visando a detecção

de fosfolipases A₂. O imunossensor desenvolvido demonstrou sensibilidade alta, por reconhecer alvos numa concentração de 20 µg/mL e alta especificidade uma vez que não foram capazes de reconhecer alvos nas células mononucleares do sangue, ilustrando sua adequação para possíveis aplicações clínicas e epidemiológicas.

5.0 - Conclusão

Neste estudo, demonstramos pela primeira vez a ação anti-parasitária de anticorpos policlonais IgY anti-PLA₂ BnSP7, uma PLA₂ isolada de peçonha de serpente. Os anticorpos produzidos em galinhas, inicialmente demonstraram potencial de reconhecimento frente a diferentes PLA₂s presentes em peçonhas de serpentes, bem como neutralizaram de forma significativa a citotoxicidade induzida pela PLA₂ BnSP-7 em células C2C12. Os anticorpos IgY anti-PLA₂ (BnSP-7) apresentaram ação citotóxica, antiproliferativa e anti-invasiva sobre formas promastigota e taquizoitos de *L. (L.) amazonensis* e *T. gondii*, respectivamente. Também reconheceram por meio de análises de ELISA e imunofluorescência proteínas presentes nos extratos bruto e solúvel e em toda a superfície desses parasitas.

Aliada a esta capacidade anti-parasitária, os anticorpos anti-BnSP-7 produzidos no presente estudo foram utilizados para a construção de um bioeletrodo de grafite modificado com nanocompósito que detectou com alta sensibilidade e especificamente alvos no extrato de formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis*. Assim, os resultados apresentados neste estudo abrem perspectivas para a utilização dos anticorpos IgY anti-PLA₂ (BnSP-7) como uma ferramenta potencial para novos estudos no tratamento e diagnóstico da leishmaniose.

6.0 – Referências

ABE, A.; SHAYMAN, J. A. Purification and Characterization of 1-O-Acylceramide Synthase, a Novel Phospholipase A₂ with Transacylase Activity. **Journal of**

Biological Chemistry v. 273, n. 14, p.8467-8474, 1998.
<https://doi.org/10.1074/jbc.273.14.8467>

AKBARI, M.R.; AHMADI, A.; MIRKALANTARI, S.; SALIMIAN, J. Anti-Vibrio cholerae IgY Antibody Inhibits Mortality in Suckling Mice Model. **Journal of the national medical association.** v.110. p.45-57, 2018.
<https://doi.org/10.1016/j.jnma.2017.04.001>

AKIBA, S.; SATO, T.. Cellular Function of Calcium-Independent Phospholipase A₂. **Biological & Pharmaceutical Bulletin.** v. 27, n. 8, p.1174-1178, 2004.
<https://doi.org/10.1248/bpb.27.1174>

AKITA, E. M.; NAKAI, S.; Comparison of four purification methods for the production of immunoglobulins from eggs laid by hens immunized with an enterotoxigenic *E. coli* strain, **J Immunol Methods.** v. 160 p. 207-214, 1993.
[https://doi.org/10.1016/0022-1759\(93\)90179-B](https://doi.org/10.1016/0022-1759(93)90179-B)

ALOULO, A.; RAHIER, R.; ARHAB, Y.; NOIRIEL, A.; ABOUSALHAM, A. Phospholipases: an overview. **Methods Mol Biol**, v.1835, p.69–105, 2018.
https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8672-9_3

ALVAR, J.; VÉLEZ, ID.; HERRERO, M.; DESJEUX, P.; CANO, J.; JANNIN, J.; BOER, M. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **PloSOne.** v. 5 p. 1-7, 2012. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035671>

ALVAREZ, A.; MONTERO, Y.; JIMENEZ, E.; ZERPA, N.; PARRILLA, P.; MALAVÉ, C. IgY antibodies anti-Tityus caripitensis venom: purification and neutralization efficacy, **Toxicon.** v.74, p.208–214, 2013.
<https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2013.08.058>

AMRO, W.A.; AL-QAISI, W.; AL-RAZEM, F. Production and purification of IgY antibodies from chicken egg yolk. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology.** v.16, p.99–103, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.jgeb.2017.10.003>

ANDRADE, F.G.; ETO, S.F.; FERRARO, A.C.N.S.; MARIOTO, D.T.G.; VIEIRA, A.P. The production and characterization of anti-bothropic and anti-crotalic IgY antibodies in laying hens: a long-term experiment, **Toxicon**. v.66, p.18–24, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2013.01.018>

ANGULO, Y.; GUTIÉRREZ, J.M.; SOARES, A.M.; CHO, W.; LOMONTE, B. Myotoxic and cytolytic activities of dimeric Lys49 phospholipase A2 homologues are reduced, but not abolished, by a pH-induced dissociation, **Toxicon**, v.46 p. 291–296, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2005.03.025>

AOKI, J.; INOUE, A.; MAKIDE, K.; SAIKI, N.; ARAI, H.; “Structure and function of extracellular phospholipase A belonging to the pancreatic lipase gene family,” **Biochimie**, v. 89, n. 2, p. 197–204, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2006.09.021>

APARICIO, I. M.; SCHARFSTEIN, J.; LIMA, A. P. C. A.; “A new cruzipain-mediated pathway of human cell invasion by *Trypanosoma cruzi* requires trypomastigote membranes,” **Infection and Immunity**, v. 72, n. 10, p. 5892–5902, 2004. <https://doi.org/10.1128/IAI.72.10.5892-5902.2004>

ARAÚJO, A. C.; VILLELA, M. M.; SENA-LOPES, Â.; FARIAS, R.; MARIA, L.; FARIA, J. D. E.; Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* and *Toxocara canis* in a human rural population of Southern Rio Grande do Sul. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**. v. 60 p. 28, 2018. <https://doi.org/10.1590/s1678-9946201860028>

ARAÚJO, A.; LOBATO, Z.; CHÁVEZ-OLÓRTEGUI, CVELARDE, D. Brazilian IgY-Bothrops antivenom: studies on the development of a process in chicken egg yolk, **Toxicon** v. 55 p. 739–744, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2009.11.004>

ARCANJO, A.F; LAROCQUE-DE-FREITAS, I.F; ROCHA JDB; ZAMITH D; COSTA-DASILVA AC; NUNES MP; The PGE2/IL-10 axis determines susceptibility of B-1

cell derived phagocytes (B-1CDP) to *Leishmania major* infection. **PLoS One**.v.1, p. e0124888, 2015.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0124888>

ARNI, R. K.; WARD, R. J.; Phospholipase A₂—a structural review, **Toxicon**. v. 34 p. 827-841, 1996. [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(96\)00036-0](https://doi.org/10.1016/0041-0101(96)00036-0)

ARNI, R.K.; FONTES, M.R.; BARBERATO, C.; GUTIÉRREZ, J.M.; DÍAZ, C.; WARD, R.J. Crystal structure of myotoxin II, a monomeric Lys49-phospholipase A₂ homologue isolated from the venom of *Cerrophidion (Bothrops) godmani*, **Arch. Biochem. Biophys.** v. 366, p.177–182, 1999. <https://doi.org/10.1006/abbi.1999.1210>

ARNI, R.K.; WARD, R.J.; GUTIERREZ, J.M.; TULINSKY, A. Structure of a calcium independent phospholipase-like myotoxic protein from *Bothrops asper* venom, **Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.** v.51, p.311–317, 1995. <https://doi.org/10.1107/S0907444994011455>

AYDIN, E.B.; SEZGINTURK, M.K. A sensitive and disposable electrochemical immunosensor for detection of SOX2, a biomarker of cancer, **Talanta**. v.172. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2017.05.048>

AYYAR, B. V.; ARORA, S.; MURPHY, C.; O’KENNEDY, R.; **Methods** v.56 p. 116–129, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2011.10.007>

BAATZ, H.; MIRSHAHI, A.; PUCHTA, J.; GUMBEL, H.; HATTENBACH, L.O. Reactivation of toxoplasma retinochoroiditis under atovaquone therapy in an immunocompetent patient. **Ocular immunology and inflammation**, Buren, v. 14, n. 3, p. 185–187, 2006. <https://doi.org/10.1080/09273940600659740>

BAINE, W. B.; **Journal of General Microbiology**, v. 134 p. 489–498, 1988. <https://doi.org/10.1099/00221287-134-2-489>

BALANDIN, A.A.; GHOSH, S.; BAO, W.; CALIZO, I.; TEWELDEBRHAN, D.; MIAO, F.; LAU, C.N. Superior thermal conductivity of single-layer graphene. **Nano Lett.** v.8, p. 902–907, 2008. <https://doi.org/10.1021/nl0731872>

BANERJI, S.; AURASS, P.; FLIEGER, A.; “The manifold phospholipases A of *Legionella pneumophila*—identification, export, regulation, and their link to bacterial virulence,” **International Journal of Medical Microbiology**, v. 298, n. 3-4, p. 169–181, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2007.11.004>

BAÑULS, A. L.; HIDE, M.; PRUGNOLLE, F.; Leishmania and the leishmaniasis: a parasite genetic update and advances in taxonomy, epidemiology and pathogenicity in humans. **Adv Parasitol.** 64:1-109, 2007.
[https://doi.org/10.1016/S0065-308X\(06\)64001-3](https://doi.org/10.1016/S0065-308X(06)64001-3)

BARBOSA, B. F., PAULESU, L., IETTA, F., BECHI, N., ROMAGNOLI, R., GOMES, A. O. Suceptibility to *Toxoplasma gondii* proliferation in BeWo human trophoblast cells is dose-dependent of macrophage migration inhibitory factor (MIF), via ERK1/2 phosphorylation and prostaglandin E2 production. **Placenta** v.35, p.152–162, 2014.
<https://doi.org/10.1016/j.placenta.2013.12.013>

BARBOSA, B.F.; SILVA, D.A.; COSTA, I.N.; MINEO, J.R.; FERRO, E.V.; BeWo trophoblast cell susceptibility to *Toxoplasma gondii* is increased by interferongamma, interleukin-10 and transforming growth factor-beta1. **Clin. Exp. Immunol.** v. 151 p. 536-545, 2008. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2007.03583.x>

BARBOSA, C. J.; MOLINA, R. J.; SOUZA, M. B.; SILVA, A. C.; MICHELETTI, A. R.; REIS, M. A.; TEIXEIRA, V. D.; SILVA-VERGARA, M. L.; Disseminated toxoplasmosis presenting as sepsis in two AIDS patients. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, v. 49, p. 113–116, 2007. <https://doi.org/10.1590/S0036-46652007000200009>

BARLOW, D.J; EDWARDS, M.S; THORNTON, J.M. Continuous and discontinuous protein antigenic determinants. **Nature**.1986; 322: 747–748.
<https://doi.org/10.1038/322747a0>

BARSAN, M. M., GHICA, M. E., BRETT, C. M. **Anal. Chim. Acta**. v.881, p.1-23, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.02.059>

BATRA, B.; KUMARI, S.; PUNDIR, C.S. Construction of glutamate biosensor based on covalent immobilization of glutamate oxidase on polypyrrole nanoparticles/polyaniline modified gold electrode. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 57, p. 69–77, 2014.
<https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2014.02.001>

BELAUNZARÁN, M. L.; LAMMEL, E. M.; E.L.D. de Isola, Phospholipases A in trypanosomatids, **J. Enzym. Res.** p. 1–10, 2011.
<https://doi.org/10.4061/2011/392082>

BELAUNZARÁN, M.L.; WAINSELBAUM, M. J.; LAMMEL, E. M. “Phospholipase A from *Trypanosoma cruzi* infective stages generates lipid messengers that activate host cell protein kinase c,” **Parasitology**, v. 134, p. 491–502, 2007.
<https://doi.org/10.1017/S0031182006001740>

BERN, C.; MAGUIRE, J. H.; ALVAR, J.; Complexities of assessing the disease burden attributable to leishmaniasis. **PLoS Negl Trop Dis**. v. 2 p. 313. 2008.
<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000313>

BERTELLO, L. E.; ALVES, M. J. M.; COLLI, W.; DE LEDERKREMER, R.M. Evidence for phospholipases from *Trypanosoma cruzi* active on phosphatidylinositol and inositolphosphoceramide, **Biochemical Journal**. v.345, p.77–84, 2000.
<https://doi.org/10.1042/bj3450077>

BESTEIRO, S.; Which roles for autophagy in *Toxoplasma gondii* and related apicomplexan parasites? **Molecular & Biochemical Parasitology**, v. 184, p. 1– 8, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2012.04.001>

BHANOT, P.; SCHAUER, K.; COPPENS, I.; NUSSENZWEIG, V. A surface phospholipase is involved in the migration of *Plasmodium* sporozoites through cells. **J Biol Chem**. v.28, p. 6752–6760, 2005. <https://doi.org/10.1074/jbc.M411465200>

BIRD, C. R.; THORPE, R.; Purification of immunoglobulin Y (IgY) from chicken eggs. **The protein protocols handbook** p. 1779–1781, 2009. <https://doi.org/10.1080/13693780310001610029>

BLACK, M. E.; BOOTHROYD, J. C.; Lytic Cycle of *Toxoplasma gondii*. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 64, p. 607-623, 2000. <https://doi.org/10.1128/MMBR.64.3.607-623.2000>

BLADER, I.J.; COLEMAN, B. I.; CHEN, C, T.; GUBBELS, M.; J.; Lytic Cycle of *Toxoplasma gondii*: 15 Years Later. **Annu Rev Microbiol**. v. 69 p, 463–485, 2015. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-091014-104100>

BOIA, M. N.; CARVALHO-COSTA, F. A.; SODRE, F. C.; PINTO, G. M.; AMENDOEIRA, M. R.; Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection among indian people living in Iauarete, Sao Gabriel da Cachoeira, Amazonas, Brazil. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**. v. 50 p.17–20, 2008. <https://doi.org/10.1590/S0036-46652008000100004>

BOLLELLA, P.; FUSCO, G.; TORTOLINI, C.; SANZO, G.; FAVERO, G.; GORTON, L.; ANTIOCHIA, R. Beyond graphene: Electrochemical sensors and biosensors for biomarkers detection. **Biosens. Bioelectron**. v.89, p.152–166, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2016.03.068>

BOLLEN, L.S.; CROWLEY, A.; STODULSKI, G.; HAU, J. Antibody production in rabbits and chickens immunized with human IgG. A comparison of titer and avidity

development in rabbit serum, chicken serum and egg yolk using three different adjuvants, **J. Immunol. Methods.** v.191, p.113–120, 1996. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(96\)00010-5](https://doi.org/10.1016/0022-1759(96)00010-5)

BONE, R.N., GAI, Y., MAGRIOTI, V., KOKOTOU, M.G., ALI, T., LEI, X. Inhibition of Ca²⁺-independent phospholipase A_{2b} (iPLA_{2b}) ameliorates islet infiltration and incidence of diabetes in NOD mice. **Diabetes** v.64, p.541-554, 2015. <https://doi.org/10.2337/db14-0097>

BOS, M.P.; TEFSSEN, B.; VOET, P.; WEYNANTS, V.; VAN PUTTEN, J.P.M.; TOMMASSEN, J. Function of neisserial outer membrane phospholipase A in autolysis and assessment of its vaccine potential. **Infect. Immun.** v.73 p.2222–2231, 2005. <https://doi.org/10.1128/IAI.73.4.2222-2231.2005>

BORDON, M. L. A. C.; LAURENTI, M. D.; RIBEIRO, S. P.; TOYAMA, M. H.; TOYAMA, D. O.; PASSERO, L. F. D. Effect of phospholipase A₂ inhibitors during infection caused by *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases.**v.21, p.24, 2018. <https://doi.org/10.1186/s40409-018-0156-9>

BORGES, I.P.; CASTANHEIRA, L.E.; BARBOSA, B.F.; D.L. NAVES DE SOUZA, R.J. DA SILVA, J.R. MINEO, K.A.Y. TUDINI, R.S. RODRIGUES, E.A.V. FERRO, V.M. RODRIGUES, 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. Rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, n. 72, p. 248-254, 1976. <https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999>

BRGLEZ, V.; LAMBEAU, G.; PETAN, T. Secreted phospholipases A₂ in cancer: Diverse mechanisms of action. **Biochimie** v.107, p.114-123, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2014.09.023>

BRINGMANN, G; THOMALE, K; BISCHOF, S; SCHNEIDER, C; SCHULTHEIS M; SCHWARZ; T, MOLL H, SCHURIGT, U. A novel *Leishmania major* amastigote assay in 96-well format for rapid drug screening and its use for discovery and evaluation of a new class of leishmanicidal quinolinium salts. **Antimicrob Agents Chemother** v.57, p.3003-3011, 2013. <https://doi.org/10.1128/AAC.02201-12>

BUCZYNSKI, M.; DUMLAO, D.; DENNIS, E.; Thematic review series: proteomics. An integrated omics analysis of eicosanoid biology, **J. Lipid Res.** v. 50 1015–1038, 2009. <https://doi.org/10.1194/jlr.R900004-JLR200>

BURDA, P.C. A *Plasmodium* phospholipase is involved in disruption of the liver stage parasitophorous vacuole membrane. **PLoS Pathog.** v.11, p.e1004760, 2015. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004760>

BURKE, J. E.; DENNIS E. A.; “Phospholipase A₂ structure/ function, mechanism, and signaling,” **Journal of lipid research**, vol. 50, pp. S237–S242, 2009. <https://doi.org/10.1194/jlr.R800033-JLR200>

BURKE, J. E.; DENNIS, E. A.; “Phospholipase A₂ biochemistry,” **Cardiovascular Drugs and Therapy**, v. 23, n. 1, p. 49–59, 2009. <https://doi.org/10.1007/s10557-008-6132-9>

CABRAL-MIRANDA, G.; DE JESUS, J.R.; OLIVEIRA, P.R.S.; BRITTO, G.S.G.; PONTES-DE- CARVALHO, L.C.; DUTRA, R.F.; ALCANTARA-NEVES, N.M. Detection of parasite antigens in *Leishmania infantum*-infected spleen tissue by monoclonal antibody-, piezoelectric-based immunosensors, **J. Parasitol.** v.100 p.73-78, 2014. <https://doi.org/10.1645/GE-3052.1>

CAI, Y.; GUO, J.; CHEN, S.; TIAN, L.; STEINMANN, P.; CHEN, M.; Chicken egg yolk antibodies (IgY) for detecting circulating antigens of *Schistosoma japonicum*, **Parasitol. Int.** v. 61 p. 385–390, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2012.01.008>

CARPER, M. J.; ZHANG, S.; TURK, J.; RAMANADHAM, S.; Skeletal muscle group VIA phospholipase A2 (iPLA₂beta): expression and role in fatty acid oxidation. **Biochemistry**. v. 47 p. 241–212, 2008. <https://doi.org/10.1021/bi800923s>

CARRUTHERS, V. B.; BOOTHROYD, J. C. Pulling together: an integrated model of *Toxoplasma* cell invasion. **Current Opinion in Microbiology**, v. 10, p. 83-89, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2006.06.017>

CARRUTHERS, V. B.; Proteolysis and *Toxoplasma* invasion. **International Journal for Parasitology**, v. 36, p. 595-600, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2006.02.008>

CARRUTHERS, V. B.; SUZUKI, Y. Effects of *Toxoplasma gondii* Infection on the Brain. **Schizophrenia Bulletin**, v.33, p. 745–751, 2007. <https://doi.org/10.1093/schbul/sbm008>

CARVALHO, L.; FERNANDES MIRANDA, L. M.; ANDRADE, L. H.; Leishmaniose mucosa: Aspectos clínicos e epidemiológicos. **Ver. Bras.** v. 73 p. 843-847, 2007. <https://doi.org/10.1590/S0034-72992007000600016>

CASSAING, S.; FAUVEL, J.; BESSIÉRES, M. H.; GUY, S.; SÉGUÉLA, J. P.; CHAP, H.; *Toxoplasma gondii* secretes a calcium-independent phospholipase A₂, **Internacional Journal for Parasitology**. v. 30 p. 1137-1142, 2000. [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(00\)00101-6](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(00)00101-6)

CASTANHEIRA, L.E.; DE SOUZA, D. L. N. B.; BARBOSA, R. J.; SILVA. MINEO, J.R; TUDINI, K. A.; RODRIGUES, R.; FERRO, E. V.; RODRIGUES, V. M.; Insights into anti-parasitism induced by a C-type lectin from *Bothrops pauloensis* venom on *Toxoplasma gondii*. **Int. J. Biol. Macromol.** 74 p. 568-574, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.11.035>

CASTILHO-PELLOSO, M.P.; FALAVIGNA, D.L.; FALAVIGNA-GUILHERME, A.L. Suspected acute toxoplasmosis in pregnant women. **Revista de Saude Publica**, v. 41, p. 27–34, 2007. <https://doi.org/10.1590/S0034-89102007000100005>

CASTRO, A.C.H.; FRANCA, E.G.; DE PAULA, L.F.; SOARES, M.M.C.N.; GOULART, L.R.; MADURRO, J.M.; BRITO-MADURRO, A.G. Preparation of genosensor for detection of specific DNA sequence of the hepatitis B virus. **Appl. Surf. Sci.** v.314, p.273-279, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2014.06.084>

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Biology. [citado 2019 junho}. Disponível em: <https://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/biology.html>

CERMINATI, S.; PAOLETTI, L.; AGUIRRE, A.; PEIRÚ, S.; MENZELLA, H.G.; CASTELLI, M.E. Industrial uses of phospholipases: current state and future applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2019. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-09658-6>

CHEN, S. C. A.; WRIGHT, L. C.; GOLDING, J. C.; SORRELL, T. C.; **The Biochemical Journal**, 347, 431–439, 2000. <https://doi.org/10.1042/bj3470431>

CHEN, S.; MULLER, M.; ZHOU, Z.; WRIGHT, L.; SORRELL, T.; **The Journal of Infectious Diseases**, v. 175 p. 414–420, 1997. <https://doi.org/10.1093/infdis/175.2.414>

COHEN, J. P.; SILVA, L.; COHEN, A.; AWATIN. J.; STURGEON, R.; Progress report on neglected tropical disease drug donation programs. **Clin Ther.** v. 38 p. 1193–1204, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.clinthera.2016.02.031>

CONROY, P.J.; HEARTY, S.; LEONARD, P.; O'KENNEDY, R.J. Antibody production, design and use for biosensor-based applications. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 20, n. 1, p. 10–26, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.semcd.2009.01.010>

CONTEH, L.; ENGELS, T.; MOLYNEUX DH. Socioeconomic aspects of neglected tropical diseases. **Lancet**. v. 375 p. 239–247, 2010. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(09\)61422-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(09)61422-7)

CORDEIRO, T. A.R.; GONCALVES, M. V.C.; FRANCO, D. L.; REIS, A. B.; MARTINS, H. R.; FERREIRA, L. F. Label-free electrochemical impedance immunosensor based on modified screen-printed gold electrodes for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis. **Talanta**. v.195, p.327–332, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.11.087>

CROFT, S. L.; SEIFERT, K.; DUCHÊNE, M.; “Antiprotozoal activities of phospholipid analogues,” **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 126, n. 2, p. 165–172, 2003. [https://doi.org/10.1016/S0166-6851\(02\)00283-9](https://doi.org/10.1016/S0166-6851(02)00283-9)

CROSS, G. A. M. “Identification, purification and properties of clone specific glycoprotein antigens constituting the surfacecoat of *Trypanosoma brucei*,” **Parasitology**, v. 71, p. 393–417, 1975. <https://doi.org/10.1017/S003118200004717X>

CUNNINGHAM, B.C; WELLS, J.A. Comparison of a structural and a functional epitope. **J Mol Biol**. v.234, p.554 –563, 1993. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1993.1611>

DA ROCHA, D. G.; FERNANDEZ, J. H.; C. M. C. DE ALMEIDA; C. L. DA SILVA; F. C. MAGNOLID; O. E. DA SILVA; W. D. DA SILVA; Development of IgY antibodies against anti-snake toxins endowed with highly lethal neutralizing activity, **European Journal of Pharmaceutical Sciences**. v.106. p.404–412, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2017.05.069>

DA SILVA GIOTTO, M.T.; GARRAT, R.C.; OLIVA, G.; MASCARENHAS, Y.P.; GIGLIO, J.R.; CINTRA, A.C.O.; DE AZEVEDO JR.; W.F.; ARNI, R.K.; WARD, R.J. Crystallographic and spectroscopic characterization of a molecular hinge: conformational changes in bothropstoxin I, a dimeric Lys49 phospholipase A₂

homologue. **Prot. Struct. Funct. Genet.** v. 30, p. 442–454, 1998.
[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0134\(19980301\)30:4<442::AID-PROT11>3.0.CO;2-I](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0134(19980301)30:4<442::AID-PROT11>3.0.CO;2-I)

DANTAS-TORRES, F.; Leishmune® vaccine: The newest tool for prevention and control of canine visceral leishmaniosis and its potential as a transmission-blocking vaccine. **Vet Parasitol** v. 141 p. 1-8, 2006.
<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.05.001>

DE ANDRADE, F.G.; ETO, S.F.; DOS SANTOS FERRARO, A.C.N.; MARIOTO, D.T.G; VIEIRA, N.J.; CHEIRUBIM, A.P.; DE PAULA RAMOS, S.; VENÂNCIO, E.J. The production and characterization of anti-boitropic and anti-crotalic IgY antibodies in laying hens: a long-term experiment. **Toxicon**. v.66, p.18–24, 2013.
<https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2013.01.018>

DE LIMA L.F.G.; BORGES R.J.; VIVIESCAS M.A.; FERNANDES C.A.H.; FONTES M.R.M. Structural studies with BnSP-7 reveal an atypical oligomeric conformation compared to phospholipases A2-like toxins. **Biochimie**. v. 142, p. 11-21, 2017.
<https://doi.org/10.1016/j.biochi.2017.07.009>

DE MEULENAER, B.; HUYGHEBAERT, A.; Food Agric. **Immunol**. 13 p. 275–288, 2001. <https://doi.org/10.1080/09540100120094537>

DE MORAIS, C. G. V.; CASTRO LIMA, A. K.; TERRA, R.; DOS SANTOS, RF.; DA-SILVA, S. A.G.; PML D. The dialogue of the host-parasite relationship: Leishmania spp and Trypanosoma cruzi infection. **Biomed Res Int**. v. 32, p. 49-54. 2015.
<https://doi.org/10.1155/2015/324915>

DE OLIVEIRA, A.H.; GIGLIO, J.R.; ANDRIÃO-ESCARSO, S.H.; ITO, A.S.; WARD, R.J. A pH-induced dissociation of the dimeric form of a lysine 49-phospholipase A₂ abolishes Ca²⁺-independent membrane damaging activity, **Biochemistry**, v. 40 p. 6912–6920, 2001. <https://doi.org/10.1021/bi0026728>

DENNIS, E. A. Phospholipases, in: P.D. Boyer (Ed.), **The Enzymes, Academic Press, New York, NY, USA**, p. 307–353, 1983. [https://doi.org/10.1016/S1874-6047\(08\)60307-8](https://doi.org/10.1016/S1874-6047(08)60307-8)

DENNIS, E. A.; “The growing phospholipase A superfamily of signal transduction enzymes,” **Trends in Biochemical Sciences**, v. 22, n. 1, p. 1–2, 1997. [https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(96\)20031-3](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(96)20031-3)

DENNIS, E. A.; J. CAO, Y. H. HSU; V. MAGRIOTI; G. KOKOTOS. Phospholipase A₂ enzymes: physical structure, biological function, disease implication, chemical inhibition, and therapeutic intervention. **Chem. Rev.** v.111, p.6130 – 6185, 2011. <https://doi.org/10.1021/cr200085w>

DENNIS, E. A.; NORRIS, P.C. Eicosanoid storm in infection and inflammation, **Nat. Rev. Immunol.** v. 15 p. 511–523, 2015. <https://doi.org/10.1038/nri3859>

DENNIS, E.A.; Introduction to Thematic Review Series: Phospholipases: Central Role in Lipid Signaling and Disease. **Journal of Lipid Research.** v. 56, p.1245-1247, 2015. <https://doi.org/10.1194/jlr.E061101>

DE-SIMONE, S.G.; NAPOLEÃO-PEGO P.; TEIXEIRA-PINTO L.A.; SANTOS J.D.; DE-SIMONE T.S.; MELGAREJO A.R.; AGUIAR A.S.; MARCHI-SALVADOR D.P. Linear B-cell epitopes in BthTX-1, BthTX-II and BthA-1, phospholipase A₂'s from Bothrops jararacussu snake venom, recognized by therapeutically neutralizing commercial horse antivenom. **Toxicon.** v. 72, p. 90-101, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2013.06.004>

DESSEN, A; TANG, J; SCHMIDT, H; STAHL, M; CLARK, J.D; SEEHRA, J. Crystal structure of human cytosolic phospholipase A₂ reveals a novel topology and catalytic mechanism. **Cell.** v.97, p.349–60, 1999. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80744-8](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80744-8)

DÍAZ, C. The effect of myotoxins isolated from *Bothrops* snake venoms on multilamellar liposomes: relationship to phospholipase A₂, anticoagulant and myotoxic activities. **Biochimica Et Biophysica Acta (bba) - Biomembranes**, v. 1070, n. 2, p.455-460,1991. [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(91\)90086-N](https://doi.org/10.1016/0005-2736(91)90086-N)

DINIZ, F.B.; UETA, R.R.; PEDROSA, A.M.C.; AREIAS, M.C.; PEREIRA, V.R.A.; SILVA, E.D.; SILVA, J.G.; JR, FERREIRA, Y.M. Gomes, Impedimetric evaluation for diagnosis of Chagas disease: antigen-antibody on metallic electrodes, **Biosens. Bioelectron.** v.19, p.79–84, 2003. [https://doi.org/10.1016/S0956-5663\(03\)00213-6](https://doi.org/10.1016/S0956-5663(03)00213-6)

DJORDJEVIC, J.T. Role of phospholipases in fungal fitness, pathogenicity, and drug development – lessons from *Cryptococcus neoformans*. **Front. Microbiol.** v.1, p.1–13, 2010. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2010.00125>

DONG, W. Synthesis of Pb nanowires-Au nanoparticles nanostructure decorated with reduced graphene oxide for electrochemical sensing. **Talanta** v.65, p.604–611, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2017.01.017>

DORRELL, N.; MARTINO, M. C.; STABLER R. A.; “Characterization of *Helicobacter pylori* PidA, a phospholipase with a role in colonization of the gastric mucosa,” **Gastroenterology**, v. 117, n. 5, p. 1098–1104, 1999. [https://doi.org/10.1016/S0016-5085\(99\)70394-X](https://doi.org/10.1016/S0016-5085(99)70394-X)

DOS SANTOS, J. I.; SOARES, A. M.; Fontes, Comparative structural studies on Lys49-phospholipases A₂ from *Bothrops* genus reveal their myotoxic site, **J. Struct. Biol.** v. 167 p. 106–116, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2009.04.003>

DUAN, H.-L.; HE, Q.-Y.; ZHOU, B.; WANG, W.-W.; B. L.; Y.-Z. ZHANG, Q.-P. DENG, Y.-F. ZHANG, X.-D. YU, Anti-Trimeresurus albolabris venom IgY antibodies: preparation, purification and neutralization efficacy, **J. Venomous Anim. Toxins Incl. Trop. Dis.** 22 v.1, p.23-30, 2016. <https://doi.org/10.1186/s40409-016-0078-3>

DUBEY, J. P.; Advances in the life cycle of *Toxoplasma gondii*. **Int J Parasitol.**; v.28 p.1019–1024, 1997. [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(98\)00023-X](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(98)00023-X)

DUBEY, J. P.; FRENKEL, J. K. Toxoplasmosis of rats: a review, with considerations of their value as an animal model and their possible role in epidemiology. **Veterinary Parasitology**, v. 77, p. 1- 32, 1998. [https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(97\)00227-6](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(97)00227-6)

DUBEY, J. P.; JONES, J. L.; *Toxoplasma gondii* infection in humans and animals in the United States. **International Journal for Parasitology**, v. 38, p. 1257–1278, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2008.03.007>

DUBEY, J. P.; RAJENDRAN, C.; COSTA, D. G. C.; FERREIRA, L. R.; KWOK, O. C. H.; QU, D.; SU, C.; VARVULO, M. F. V.; ALVES, L. C.; MOTA, R. A.; SILVA, J. C. R.; New *Toxoplasma gondii* genotypes isolated from free-range chickens from the Fernando de Noronha, Brazil: unexpected findings. **Journal of Parasitology**, v. 96, p. 709–712, 2010. <https://doi.org/10.1645/GE-2425.1>

DUMETRE, A.; LE BRAS, C.; BAFFET, M.; MENECEUR, P.; DUBEY, J. P.; DEROUIN, F.; DUGUET, J. P.; JOYEUX, M.; MOULIN, L. Effects of ozone and ultraviolet radiation treatments on the infectivity of *Toxoplasma gondii* oocysts. **Veterinary Parasitology**, v. 153, n. 3-4, p. 209-213, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2008.02.004>

DUNCAN, R. E.; SARKADI-NAGY, E.; JAWORSKI, K.; AHMADIAN, M.; SUL, H. S.; Identification and functional characterization of adipose specific phospholipase A₂ (AdPLA). **J Biol Chem** v. 283 p. 428–436, 2008. <https://doi.org/10.1074/jbc.M804146200>

DUPONT, C. D.; CHRISTIAN, D. A.; HUNTER, C. A.; Immune response and immunopathology during toxoplasmosis. **Semin Immunopathol.** v. 34 p. 793–813, 2012. <https://doi.org/10.1007/s00281-012-0339-3>

EGOROV, A. I.; CONVERSE, R.; GRIFFIN, S. M.; STYLES, J.; KLEIN, E.; SAMS E.; Environmental risk factors for *Toxoplasma gondii* infections and the impact of latent infections on allostatic load in residents of Central North Carolina. **BMC Infect Dis.** v.18 p. 421, 2018. <https://doi.org/10.1186/s12879-018-3343-y>

EINTRACHT, J.; MAATHAI, R.; MELLORS, A.; RUBEN, L. “Calcium entry in *Trypanosoma brucei* is regulated by phospholipase A₂ and arachidonic acid,” **Biochemical Journal**, vol. 336, no. 3, pp. 659–666, 1998. <https://doi.org/10.1042/bj3360659>

ELMORE, S. A.; JENKINS, E. J.; HUYVAERT, K. P.; POLLEY, L.; ROOT, J. J.; MOORE, C.G.; *Toxoplasma gondii* in Circumpolar People and Wildlife. **Vector-Borne Zoonotic Dis.** v 12 p. 1–9, 2012. <https://doi.org/10.1089/vbz.2011.0705>

ELSHEIKHA, H. M.; Congenital toxoplasmosis: priorities for further health promotion action. **Public Health**, v. 122, p. 335-353, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.puhe.2007.08.009>

FASSINA G, VERDOLIVA A, PALOMBO G, RUVO M AND CASSANI G. Immunoglobulin specificity of TG19318: a novel synthetic ligand for antibody affinity purification. *Journal of Molecular Recognition* 11: 128–133, 1998. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-1352\(199812\)11:1/6<128::AID-JMR408>3.0.CO;2-8](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-1352(199812)11:1/6<128::AID-JMR408>3.0.CO;2-8)

FELIX, F.S.; ANGNES, L. Electrochemical immunosensors – a powerful tool for analytical applications. **Biosensors and Bioelectronic.** v.45, p.98-106. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2017.11.029>

FERNANDES, C. A. H.; COMPARETTI, E. J.; BORGES, R. J.; HUANCHAHUIRE-VEGA, S.; PONCE-SOTO, L. A.; MARANGONI, S.; Structural bases for a complete myotoxic mechanism: Crystal structures of two non-catalytic phospholipases A₂-like from *Bothrops brazili* venom, **Biochim. Biophys. Acta** v. 1834 p. 2772–2781, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2013.10.009>

FERNANDES, C.A.H.; MARCHI-SALVADOR, D.P.; SALVADOR, G.M.; SILVA, M.C.O.; COSTA, T.R.; SOARES, A.M. Comparison between apo and complexed structures of bothropstoxin-I reveals the role of Lys122 and Ca²⁺-binding loop region for the catalytically inactive Lys49–PLA₂s, **J. Struct. Biol.** v.171, p.31–43, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2010.03.019>

FERREIRA, F.B.; M.S.R. GOMES; D.L.N. DE SOUZA; S.N.C. GIMENES; L.E. CASTANHEIRA; M.H. BORGES; R.S. RODRIGUES; K.A.G. YONEYAMA; M.I.H. BRANDEBURGO; V.M. RODRIGUES. Molecular cloning and pharmacological properties of an acidic PLA₂ from *Bothrops pauloensis* snake venom, **Toxins**. v.5 p.2403–2419, 2013. <https://doi.org/10.3390/toxins5122403>

FERREIRA, L.F.; SOUZA, L.M.; FRANCO, D.L.; CASTRO, A.C.H.; OLIVEIRA, A.A.; BOODTS, J.F C.; BRITO-MADURRO, A.G.; MADURRO, J.M. Formation of novel polymeric films derived from 4-hydroxybenzoic acid. **Mater. Chem. Phys.**, v.129, p.46-52, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.matchemphys.2011.03.053>

FLIEGER, A.; GONG, S.; FAIGLE, M.; DEEG, M.; BARTMANN, P.; NEUMEISTER, B.; **Journal of Bacteriology**, v.182 p. 1321–1327, 2000. <https://doi.org/10.1128/JB.182.5.1321-1327.2000>

FLIEGER, A.; GONG, S.; FAIGLE, M.; STEVANOVIC, S.; CIANCOTTO, N. P.; NEUMEISTER, B.; **Journal of Bacteriology**, v. 183 p. 2121–2124, 2001. <https://doi.org/10.1128/JB.183.6.2121-2124.2001>

FLORIN-CHRISTENSEN, M.; FLORIN-CHRISTENSEN, J.; DE ISOLA, E. D. Temperature acclimation of *Trypanosoma cruzi* epimastigote and metacyclic

trypomastigote lipids. **Molecular and Biochemical Parasitology**. v.88, p.25–33, 1997. [https://doi.org/10.1016/S0166-6851\(97\)00056-X](https://doi.org/10.1016/S0166-6851(97)00056-X)

FRANCIS, B. Myotoxin II from *Bothrops asper* (terciopelo) venom is a lysine-49 phospholipase A₂. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. v. 284, n. 2, p.352-359,1991. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(91\)90307-5](https://doi.org/10.1016/0003-9861(91)90307-5)

FU, C.Y.; HUANG, H.; WANG, X.M.; LIU, Y.G.; WANG, Z.G.; CUI, S.J.; GAO, H.L.; LI, Z.; LI, J.P.; KONG, X.G. Preparation and evaluation of anti-SARS coronavirus IgY from yolks of immunized SPF chickens, **J. Virol. Methods** v.133, p.112–115, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2005.10.027>

FUNK, C. D.; Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology, **Science**. v. 294 p. 1871–1875, 2001. <https://doi.org/10.1126/science.294.5548.1871>

GADDE, U.; RATHINAM, T.; LILLEHOJ, H.S. Passive immunization with hyperimmune egg-yolk IgY as prophylaxis and therapy for poultry diseases – A review. **Animal Health Research Reviews**. v.4, p.1-14, 2015. <https://doi.org/10.1017/S1466252315000195>

GEORGAKILAS, V.; OTYEPKA, M.; BOURLINOS, A.B.; CHANDRA, V.; KIM, N.; KEMP, K.C.; HOBZA, P.; ZBORIL, R.; KIM, K.S. Functionalization of graphene: Covalent and non-covalent approaches, derivatives and applications. **Chem. Rev**. v.112, p.6156–6214, 2012. <https://doi.org/10.1021/cr3000412>

GHANNOUN, M. A.; *Clinical Microbiology Review*, v. 13 p. 122–143, 2000. <https://doi.org/10.1128/CMR.13.1.122-143.2000>

GÓMARA, M.J.; ERCILLA, G.; ALSINA, M.A.; HARO, I. Assessment of synthetic peptides for hepatitis A diagnosis using biosensor technology. **Journal of Immunological Methods**, v. 246, n. 1-2, p. 13–24, 2000. [https://doi.org/10.1016/S0022-1759\(00\)00295-7](https://doi.org/10.1016/S0022-1759(00)00295-7)

GOMES, A. F., MAGALHÃES, K. G., RODRIGUES, R. M., DE CARVALHO, L., MOLINARO, R., BOZZA, P. T. *Toxoplasma gondii*-skeletal muscle cells interaction increases lipid droplet biogenesis and positively modulates the production of IL-12, IFN-g and PGE2. **Parasit. Vectors**. p.47, 2014. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-47>

GOMEZ-MARÍN, J. E.; EL'BTAOURI, H.; BONHOMME, A. "Involvement of secretory and cytosolic phospholipases A₂ during infection of IHP1 human monecytic cells with *Toxoplasma gondii*. Effect of interferon γ ," **Parasitology Research**, vol. 88, no. 3, pp. 208–216, 2002. <https://doi.org/10.1007/s00436-001-0525-z>

GOMEZ-MARÍN, J. E.; EL'BTAOURI, H.; BONHOMME, A.; "Involvement of secretory and cytosolic phospholipases A₂ during infection of IHP1 human monecytic cells with *Toxoplasma gondii*. Effect of interferon γ ," **Parasitology Research**, v. 88, n. 3, p. 208–216, 2002. <https://doi.org/10.1007/s00436-001-0525-z>

GONTIJO, B.; CARVALHO, M.L.R. American cutaneous leishmaniasis. **Rev Soc Bras Med Trop**. 36:71-80, 2003. <https://doi.org/10.1590/S0037-86822003000100011>

GONTIJO, C.M; MELO, M.N. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. **Rev Bras Epidemiol**. v.7p.338-349, 2004. <https://doi.org/10.1590/S1415-790X2004000300011>

GONZÁLEZ-GARZA, M. T.; CASTRO-GARZA, J.; CRUZ-VEJA, D. E. "*Entamoeba histolytica*: diminution of erythrophagocytosis, phospholipase A₂, and hemolytic activities is related to virulence impairment in long-term axenic cultures," **Experimental Parasitology**, v. 96, no. 2, p. 116–119, 2000. <https://doi.org/10.1006/expr.2000.4554>

GOPINATH, S.C.B.; TANG, T.-H.; CITARTAN, M.; CHEN, Y.; LAKSHMIPRIYA, T. Current aspects in immunosensors. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 57, p. 292–302, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2014.02.029>

GRANDO, T. H.; BALDISSERA, M. D.; DE SÁ, M. F.; DO CARMO, G.; PORTO, B. C. Z.; AGUIRRE, G. S. V.; Avian antibodies (IgY) against *Trypanosoma cruzi*: purification and characterization studies, **J. Immunol. Methods** v. 449 p. 56–61, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2017.07.002>

GRIMALDI, G. J.R, TESH, R.B. Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for future research. **Clin Microbiol Rev.** p. 230-250, 1993. <https://doi.org/10.1128/CMR.6.3.230>

GRUPPI, A.; CERB´AN, F. M.; VOTTERO-CIMA, E.; “Exoantigens from *Trypanosoma cruzi* contain cruzipain,” **Acta Tropica**, v. 63, n. 2-3, p. 141–149, 1997. [https://doi.org/10.1016/S0001-706X\(96\)00616-X](https://doi.org/10.1016/S0001-706X(96)00616-X)

GRZYWA, R.; ŁUPICKA-SŁOWIK, A.; WALCZAK, M.; IDZI, M.; BOBREK, K.; BOIVIN, S. Highly sensitive detection of cancer antigen 15-3 using novel avian IgY antibodies. **Altex.** v.31, p.43–52, 2014. <https://doi.org/10.14573/altex.1309181>

GUEDES, A. C. M.; CARVALHO, M. L. R.; MELO, M.N.; Leishmaiose tegumentar americana: apresentação pouco comum. **Anais Brasileiro Dermatologia.** v. 83 p. 445-449, 2008. <https://doi.org/10.1590/S0365-05962008000500009>

GUO, M.; DUBEY. JP.; HILL, D.; BUCHANAN, RL.; GAMBLE, HR.; JONES, J. L.; PRADHAN, A. K.; Prevalence and Risk Factors for *Toxoplasma gondii* Infection in Meat Animals and Meat Products Destined for Human Consumption. **J. Food Prot.** v. 78 p. 457–476, 2015. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-14-328>

GUTIÉRREZ, J. M.; LOMONTE, B.; Phospholipase A₂: Unveiling the secrets of a functionally versatile group of snake venom toxins, **Toxicon.** v. 62 p. 27-39, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2012.09.006>

GUTIÉRREZ, J.M; HIGASHI, H.G; WEN, F.H; BURNOU, F.T. STRENGTHENING ANTIVENOM PRODUCTION IN CENTRAL AND SOUTH AMERICAN PUBLIC LABORATORIES: REPORT OF A WORKSHOP. **Toxicon**, v.49, p. 30-37, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2006.09.005>

GUTIÉRREZ, J.M; LEON, G; LOMONTE, B. Pharmacokinetic-pharmacodynamic relationships of immunoglobulin therapy for envenomation. **Clin Pharmacokinet**, 2003. <https://doi.org/10.2165/00003088-200342080-00002>

HALPERN, A. L.; KOHTZ, P. D.; ROVE, J. Y.; AO, L.; MENG, X.; FULLERTON, D. A.; WEYANT, M. J. Inhibition of secretory phospholipase A₂ Ila attenuates prostaglandin E₂-induced invasiveness in lung adenocarcinoma. **Molecular and Cellular Biochemistry**, 2019. <https://doi.org/10.1007/s11010-019-03500-3>

HAMBREY, P. N.; MELLORS, A.; TIZARD, I. R. "The phospholipases of pathogenic and non-pathogenic Trypanosoma species," **Molecular and Biochemical Parasitology**. v.2, no. 3-4, p.177–186, 1981. [https://doi.org/10.1016/0166-6851\(81\)90098-0](https://doi.org/10.1016/0166-6851(81)90098-0)

HAMEED, S., XIE, L., YING, Y., **Trends Food Sci. Technol.** v.81, 61-73, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.05.020>

HANDLER, M.Z., P.A. PATEL, R. KAPILA, Y. AL-QUBATI, AND R.A. SCHWARTZ. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis: Differential diagnosis, diagnosis, histopathology, and management. **J. Am. Acad. Dermatol.** v. 73 p. 26–28, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2014.08.051>

HATTA, H.; TSUDA, K.; AKACHI, S.; KIM, M.; YAMAMOTO, T. Productivity and some properties of egg yolk antibody (IgY) against human rotavirus compared with rabbit IgG. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v.57, n.3, p.450-454, 1993. <https://doi.org/10.1271/bbb.57.450>

HE, J.X.; THIRUMALAI, D.; SCHADE, R.; ZHANG, X.Y. Chronobiological studies of chicken IgY: Monitoring of infradian, circadian and ultradian rhythms of IgY in blood and yolk of chickens. **Veterinary Immunology and Immunopathology**. v.160, p.266–272, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2014.05.016>

HENNESSEY, H.; AFARA, N.; OMANOVIC, S.; PADJEN, A.L. Electrochemical investigations of the interaction of C-reactive protein (CRP) with a CRP antibody chemically immobilized on a gold surface. **Analytica Chimica Acta**, v. 643, n. 1-2, p. 45–53, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2009.04.009>

HENRIQUES, C.; ATELLA, G. C.; BONILHA, V. L.; DE SOUZA, W. “Biochemical analysis of proteins and lipids found in parasitophorous vacuoles containing *Leishmania amazonensis*,” **Parasitology Research**. v.89, p.123–133, 2003. <https://doi.org/10.1007/s00436-002-0728-y>

HERMANSSON, M.; HEANNINEN, S.; HOKYNAR, K.; SOMERHARJU, P.; The PNPLA-family phospholipases involved in glycerophospholipid homeostasis of HeLa cells. **Biochim Biophys Acta**. v. 1861 p. 1058–1065, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2016.06.007>

HIGUCHI, D. A.; BARBOSA, C. M. V.; BINCOLETTO, C.; CHAGAS, J. R.; MAGALHAES, A.; RICHARDSON, M.; SANCHEZ, E. F.; PESQUERO, J. B.; ARAUJO, R. C.; PESQUERO, J. L. Purification and partial characterization of two phospholipase A₂ from *Bothrops leucurus* (white-tailed-jararaca) snake venom. **Biochimie**, v. 89, p. 319-328, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2006.10.010>

HILL, D. E.; CHIRUKANDOTH, S.; DUBEY, J. P. Biology and epidemiology of *Toxoplasma gondii* in man and animals. **Animal Health Research Reviews**. v. 6, p. 41-61, 2005. <https://doi.org/10.1079/AHR2005100>

HIRABAYASHI, T.; MURAYAMA, T.; SHIMIZU, T.; “Regulatory mechanism and physiological role of cytosolic phospholipase A₂,” **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 27, n. 8, p.1168–1173, 2004. <https://doi.org/10.1248/bpb.27.1168>

HIRAOKA, M.; ABE, A.; SHAYMAN, J. A.; Structure and function of lysosomal phospholipase A₂: identification of the catalytic triad and the role of cysteine residues. **J Lipid Res.** v. 46 p. 2441–2447, 2005. <https://doi.org/10.1194/jlr.M500248-JLR200>

HOMSI-BRANDEBURGO, M.I.; QUEIROZ, L.S.; SANTO-NETO, H.; RODRIGUES-SIMIONI, L.; J.R. GIGLIO, Fractionation of *Bothrops jararacussu* snake venom: partial chemical characterization and biological activity of bothropstoxin, **Toxicon**. v.26, p.615–627, 1988. [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(88\)90244-9](https://doi.org/10.1016/0041-0101(88)90244-9)

HORIE, K.; HORIE, N.; ABDOU, A. M.; YANG, J.; YUN, S.; CHUN, H.; Suppressive effect of functional drinking yogurt containing specific egg yolk immunoglobulin on *Helicobacter pylori* in humans, **J. Dairy Sci.** v. 87 p. 4073–4079, 2004. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(04\)73549-3](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(04)73549-3)

HO-YEN, D. O.; Toxoplasmosis. **Medicine (Baltimore)**. v. 37 p. 665–667, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.mpmed.2009.09.006>

HUANG, J., HONDA, W. CED: a conformational epitope database. **BMC Immunol.** 2006; v.7, p.7-10, 2006. <https://doi.org/10.1186/1471-2172-7-7>

HWANG, Y. S., SHIN, J. H., YANG, J. P., JUNG, B. K., LEE, S. H., AND SHIN, E. H. Characteristics of infection immunity regulated by *Toxoplasma gondii* to maintain chronic infection in the brain. **Front. Immunol.** v.9, p.158, 2018. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00158>

INOUE, K.; ARAI, H.; AOKI, J. Phospholipase A₁ Structures, Physiological and Patho-physiological Roles in Mammals. **Lipases and Phospholipases in Drug Development**. p.23-39, 2005. <https://doi.org/10.1002/3527601910.ch2>

ISHIGURO, S.; KAWAI-ODA, A.; UEDA, J.; NISHIDA, I.; OKADA, K.; “The defective in anther dehiscence1 gene encodes a novel phospholipase A1 catalyzing the initial step of jasmonic acid biosynthesis, which synchronizes pollen maturation, anther dehiscence, and flower opening in Arabidopsis,” **Plant Cell**, v. 13, n. 10, p. 2191–2209, 2001. <https://doi.org/10.1105/tpc.010192>

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

JAWORSKI, K.; AHMADIAN, M.; DUNCAN, R. E.; SARKADI-NAGY, E.; VARADY, K. A.; HELLERSTEIN, M. K.; LEE, H. Y.; SAMUEL, V. T.; SHULMAN, G. I.; KIM, K. H.; DE VAL, S.; KANG, C.; SUL, H. S.; () AdPLA ablation increases lipolysis and prevents obesity induced by high-fat feeding or leptin deficiency. **Nat Med** v. 15 p. 159–168, 2009. <https://doi.org/10.1038/nm.1904>

JEFFREY, D.; KRAVETZ, M. D.; DANIEL, G.; FEDERMAN, M. D. Toxoplasmosis in pregnancy. **The American Journal of Medicine**, v. 118, p. 212-216, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2004.08.023>

JENKINS, C. M.; YAN, W.; MANCUSO, D. J.; GROSS, R. W.; Highly selective hydrolysis of fatty acyl-CoAs by calcium-independent phospholipase A₂ beta. Enzyme autoacylation and acyl-CoA-mediated reversal of calmodulin inhibition of phospholipase A₂ activity. **J Biol Chem**. v. 281 p. 615–624, 2006. <https://doi.org/10.1074/jbc.M511623200>

JENSENIUS, J.C.; ANDERSEN, I.; HAU, J.; CRONE, M.; KOCH, C. Eggs: conveniently packaged antibodies, methods for purification of yolk IgG. **Journal of Immunological Methods** v.46, p.63–68, 1981. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(81\)90333-1](https://doi.org/10.1016/0022-1759(81)90333-1)

JONES, E. J.; KORCSMAROS, T.; CARDING, S. R.; Mechanisms and pathways of *Toxoplasma gondii* transepithelial migration. **Tissue Barriers**. v. 5 p. 1–11, 2017. <https://doi.org/10.1080/21688370.2016.1273865>

JONES, J. L.; DARGELAS, V.; ROBERTS, J.; PRESS, C.; REMINGTON, J. S.; MONTOYA, J. G.; Risk Factors for *Toxoplasma gondii* Infection in the United States. **Clin Infect Dis**, v. 49 p. 878–84, 2009. <https://doi.org/10.1086/605433>

KANG, T.S.; GEORGIEVA, D.; GENOV, N.; MURAKAMI, M.T; SINHA, M.; KUMAR, R. P.; KAUR, P.; KUMAR, S.; DEY, S.; SHARMA, S.; VRIELINK.; A.; BETZEL, C.; TAKEDA, S.; ARNI, R.K.; SINGH, T.P.; KINI, R. M. Enzymatic toxins from snake venom: structural characterization and mechanism of catalysis. **FEBS Journal**, v. 278, p. 4544–4576, 2011. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2011.08115.x>

KARABINA, S.A., GORA, S., ATOUT, R., NINIO, E. Extracellular phospholipases in atherosclerosis. **Biochimie** v.92, p.594-600, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2010.02.002>

KIM, H.; NAKAI, S. Immunoglobulin separation from egg yolk: a serial filtration system. **Journal of Food Science** v.61, p.510–512, 1996. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1996.tb13144.x>

KIM, K.; WEISS, L. M.; *Toxoplasma gondii*: the model apicomplexan. **International Journal for Parasitology**, v. 34, n. 3, p. 423-432, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2003.12.009>

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

KITSIOULI, E.; NAKOS, G.; LEKKA, M. E.; Phospholipase A₂ subclasses in acute respiratory distress syndrome. **Biochim Biophys Acta** v.1792, p.941–953, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2009.06.007>

KO, K.; AHN, D.; Poul. **Sci.** v. 86 p. 400–407, 2007. <https://doi.org/10.1093/ps/86.2.400>

KÖHLER, G. A. Phospholipase A₂ and Phospholipase B activities in fungi. **Biochimica Et Biophysica Acta (bba) - Molecular and Cell Biology of Lipids**. v. 1761, n. 11, p.1391-1399, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2006.09.011>

KOVACS-NOLAN, J.; MINE, Y. Egg yolk antibodies for passive immunity. **Annual Review of Food Science and Technology**, v.3, n.12, p.163-182, 2012. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-022811-101137>

KRIZAJ, I.; BIEBER, A.L.; RITONJA, A.; GUBENSĚK, F. The primary structure of ammodytin L, a myotoxic phospholipase A₂ homologue from Vipera ammodytes venom. **Eur. J. Biochem.** v. 202, p. 1165–1168, 1991. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1991.tb16485.x>

KUILA, T.; BOSE, S.; MISHRA, A.K.; KHANRA, P.; KIM, N.H.; LEE, J.H. Chemical functionalization of graphene and its applications. **Prog. Mater. Sci.** v.57, p.1061–1105, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.pmatsci.2012.03.002>

KURONEN, I.; KOKKO, H.; MONONEN, I.; PARVIAINEN, M. Hen egg yolk antibodies purified by antigen affinity under highly alkaline conditions provide new tools for diagnostics. Human intact parathyrin as model antigen. **European Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry** v.35, p.435–440, 1997. <https://doi.org/10.1515/cclm.1997.35.6.435>

KYTE, J.; DOOLITTLE, R.F. A simple method for displaying the hydrophobic character of a protein, **J. Mol. Biol.** v.157, p.105–132, 1982. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(82\)90515-0](https://doi.org/10.1016/0022-2836(82)90515-0)

LAEMMLI, U. K.; Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature.** v. 227 p. 680-685, 1970.

<https://doi.org/10.1038/227680a0>

LALIBERTÉ, J.; CARRUTHERS, V. B. Host cell manipulation by the human pathogen *Toxoplasma gondii*. **Cell. Mol. Life Sci.** 65, 1900–1915, 2008.

<https://doi.org/10.1007/s00018-008-7556-x>

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

<https://doi.org/10.1007/s00436-006-0306-9>

LAUSTSEN, A.H., ENGMARK, M., CLOUSER, C., TIMBERLAKE, S., VIGNEAULT, F., GUTIÉRREZ, J.M., LOMONTE, B. Exploration of immunoglobulin transcriptomes from mice immunized with three finger toxins and phospholipases A₂ from the Central American coral snake *Micrurus nigrocinctus*. **PeerJ.** v.5, p.2924, 2017.

<https://doi.org/10.7717/peerj.2924>

LAVER, W.G.; AIR, G.M.; WEBSTER, R.G.; SMITH-GILL, S.J. Epitopes on protein antigens: misconceptions and realities, **Cell.** v.61, p.553-556, 1990.

[https://doi.org/10.1016/0092-8674\(90\)90464-P](https://doi.org/10.1016/0092-8674(90)90464-P)

LAWAL, A.T. Synthesis and utilisation of graphene for fabrication of electrochemical sensors. **Talanta.** v.131, p.424–443, 2015.

<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2014.07.019>

LEE, C.H.; LEE, Y.C.; LEE, Y.L.; LEU, S.J.; LIN, L.T.; CHEN, C.C.; CHIANG, J.R.; MWALE, P.F.; TSAI, B.Y.; HUNG, C.S.; YANG, Y.Y. Single Chain Antibody Fragment against Venom from the Snake *Daboia russelii formosensis*. **Toxins.** v.9, p.2-19, 2017.

<https://doi.org/10.3390/toxins9110347>

LEE, C.H.; LEE, Y.C.; LEU, S.J.; LIN, L.T.; CHIANG, J.R.; HSU, W.J.; YANG, Y. Y. Production and Characterization of Neutralizing Antibodies against *Bungarus multicinctus* Snake Venom. **Applied and Environmental Microbiology**. v.82, p. 6973- 6982, 2016. <https://doi.org/10.1128/AEM.01876-16>

LEE, J.H.; PARK, S.J.; CHOI, J.W. Electrical Property of Graphene and Its Application to Electrochemical Biosensing. **Nanomaterials**, v.9, p.297-301, 2019. <https://doi.org/10.3390/nano9020297>

LEE, W.H.; DA SILVA GIOTTO, M.T.; MARANGONI, S.; TOYAMA, M.H.; POLIKARPOV, I.; GARRATT, R.C. Structural basis for low catalytic activity in Lys49 phospholipases A₂—a hypothesis: the crystal structure of piratoxin II complexed to fatty acid, **Biochemistry** (Mosc) v.40, p.28–36, 2001. <https://doi.org/10.1021/bi0010470>

LEIVA, C.L.; CANGELOSI, A.; MARICONDA, V.; FARACE, M.; GEOGHEGAN, P.; BRERO, L.; FERNÁNDEZ-MIYAKAWA, M.; CHACANA, P. IgY-based antivenom against *Bothrops alternatus*: Production and neutralization Efficacy. **Toxicon**. v.100, p.112-119, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2019.03.020>

LESLIE, G. A.; CLEM, L. W.; Phylogeny of immunoglobulin structure and function, **J. Exp. Med.** v. 130 p. 1337–1352, 1969. <https://doi.org/10.1084/jem.130.6.1337>

LESNIEROWSKI, G.; STANGIERSKI, J. What's new in chicken egg research and technology for human health promotion? - A review. **Trends in Food Science & Technology**. v.71, p.46–51, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.10.022>

LESSA, M.M.; LESSA, H. Á.; CASTRO, T. W. N.; OLIVEIRA, A.; SCHERIFER, A.; MACHADO, P.; Mucosal leishmaniasis: epidemiological and clinical aspects. **Braz J Otorhinolaryngol.** v. 73 p. 843-847, 2007. <https://doi.org/10.1590/S0034-72992007000600016>

LÉVÊQUE, M.F. TgPL₂, a patatin-like phospholipase domain-containing protein, is involved in the maintenance of apicoplast lipids homeostasis in *Toxoplasma*. **Mol Microbiol.** v.0, p.1–17, 2017. <https://doi.org/10.1111/mmi.13694>

LI, R.; HUANG, H.; HUANG, L.; LIN, Z.; GUO, L.; QIU, B.; CHEN, G. Electrochemical biosensor for epidermal growth factor receptor detection with peptide ligand. **Electrochimica Acta**, v. 109, p. 233–237, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2013.07.151>

LIBERATOR, P.; White, M. W. Changes in the expression of human cell division autoantigen-1 influence *Toxoplasma gondii* growth and development. **PLoS Pathogens**, v. 2, p. 105, 2006. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0020105>

LIEBANA, S.; BRANDAO, D.; P. CORTES, D.; CAMPOY, S.; ALEGRET, S.; PIVIDORI, M.I. Electrochemical genosensing of *Salmonella*, *Listeria* and *Escherichia coli* on silica magnetic particles, **Anal. Chim. Acta.** v.904, p.1-9, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.09.044>

LIO, Y. C.; DENNIS, E. A.; Interfacial activation, lysophospholipase and transacylase activity of group VI Ca²⁺-independent phospholipase A₂. **Biochim Biophys Acta.** v. 1392 p. 320–332, 1998. [https://doi.org/10.1016/S0005-2760\(98\)00049-6](https://doi.org/10.1016/S0005-2760(98)00049-6)

LIRA, R.; CONTRERAS, L. M.; SANTA RITA, R. M.; URBINA, J. A.; “Mechanism of action of anti-proliferative lysophospholipid analogues against the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*: potentiation of in vitro activity by the sterol biosynthesis inhibitor ketoconazole,” **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 47, n. 5, p. 537–546, 2001. <https://doi.org/10.1093/jac/47.5.537>

LIU, J.; HE, Q.; WANG, W.; ZHOU, B.; LI, B.; ZHANG, Y.; LUO, C.; CHEN, D.; TANG, J.; YU, X. Preparation and neutralization efficacy of IgY antibodies raised against *Deinagkistrodon acutus* venom, **Journal of Venomous Animals and**

Toxins including Tropical Diseases. v.14, p.23-22, 2017.
<https://doi.org/10.1186/s40409-017-0112-0>

LIU, J.; LIU, Z.; BARROW, C.J.; YANG, W. Molecularly engineered graphene surfaces for sensing applications: A review. **Anal. Chim. Acta.** v.859, p.1–19, 2015.
<https://doi.org/10.1016/j.aca.2014.07.031>

LOMONTE, B.; ANGULO, Y.; MORENO, E. Synthetic Peptides Derived from the C-Terminal Region of Lys49 Phospholipase A₂ Homologues from *Viperidae* Snake Venoms: Biomimetic Activities and Potential Applications. **Current Pharmaceutical Design,** v. 16, n. 28, p.3224-3230, 2010.
<https://doi.org/10.2174/138161210793292456>

LOMONTE, B.; ANGULO, Y.; SANTAMARÍA, C. Comparative study of synthetic peptides corresponding to region 115-129 in Lys49 myotoxic phospholipases A₂ from snake venoms. **Toxicon,** v. 42, p. 307-312, 2003.
[https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(03\)00149-1](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(03)00149-1)

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>

LÖSCH, U.; SCHRANNER, I.; WANKE, R.; JÜRGENS, L. The chicken egg, an antibody source. **Journal of Veterinary Medicine Series B.** v.33, p.609– 619, 1986.
<https://doi.org/10.1111/j.1439-0450.1986.tb00076.x>

LUJAN, H. D.; BRONIA, D. H. “Intermembrane lipid transfer during *Trypanosoma cruzi*-induced erythrocyte membrane destabilization,” **Parasitology,** vol. 108, no. 3, pp. 323–334, 1994. <https://doi.org/10.1017/S0031182000076162>

LUX, H.; HEISE, N.; KLENNER, T.; HART, D.; OPPERDOES, F. R.; “Ether-lipid (alkyl-phospholipid) metabolism and the mechanism of action of ether-lipid analogues in Leishmania,” **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 111, n. 1, p. 1–14, 2000. [https://doi.org/10.1016/S0166-6851\(00\)00278-4](https://doi.org/10.1016/S0166-6851(00)00278-4)

MAGRO, A. J., SOARES, A.M., GIGLIO, J.R., FONTES, M.R.M. Crystal structures of BnSP-7 and BnSP-6, two Lys49-phospholipases A₂: quaternary structure and inhibition mechanism insights. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 311, p. 713–720, 2003. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2003.10.047>

MAK, T.W; SAUNDERS, M.E. Chapter 6 -the nature of antigen-antibody interaction. In: Mak TW, Saunders ME, editors. The immune response. Basic and clinical principles. Oxford (UK): **Elsevier Academic Press**; 2006. p. 121-46. <https://doi.org/10.1016/B978-012088451-3.50008-9>

MAROBIN, L.; FLORES, M. L; RIZZATTI, B. B. Prevalência de anticorpos para Toxoplasma gondii em emas (Rhea americana) em diferentes criatórios do Estado do Rio Grande do Sul. **The Brazilian Journal Veterinary Research and Animal Science**, v. 41, p. 5-9, 2004. <https://doi.org/10.1590/S1413-95962004000100001>

MARTIN-IGUACEL, R.; AHLSTRÖM, M. G.; TOUMA, M.; ENGSIG, F. N.; STÆRKE, N. B.; STÆRKIND, M.; OBEL, N.; RASMUSSEN, L. D.; Incidence, presentation and outcome of toxoplasmosis in HIV infected in the combination antiretroviral therapy era. **J. Infect.** v. 75 p. 263–273, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2017.05.018>

MAURY, E.; PREROST, M. C.; NAUZE, M.; REDOULES, D.; TARROUX, R.; CHARRERON, M.; **Biochemical and Biophysical Research Communication**, v. 295 p. 362–369, 2002. [https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(02\)00657-5](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(02)00657-5)

MELO, L. L.; MENDES, M. M.; ALVES; ISABEL, T. F.; VIEIRA, S.A.P.B.; GIMENES, S.N.C.; SOARES, A.M.; RODRIGUES, V.M.; IZIDORO, L.F.M. Cross-reactivity and inhibition myotoxic effects induced by *Bothrops* snake venoms using specific polyclonal anti-BnSP7 antibodies. **Biologicals**. p.1-8, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2017.08.002>

MENDEL, I.; KERLERO DE ROSBO, N; BEN-NUN, A. Delineation of the minimal encephalitogenic epitope within the immunodominant region of myelin oligodendrocyte glycoprotein: diverse V beta gene usage by T cells recognizing the core epitope encephalitogenic for T cell receptor V beta b and T cell receptor V beta a H-2b mice. **Eur. J. Immunol.** v.26, p.2470-2479, 1996. <https://doi.org/10.1002/eji.1830261030>

MENDEZ, O.A., KOSHY, A.A. *Toxoplasma gondii*: entry, association, and physiological influence on the central nervous system. **PLoS Path.** 13, e1006351, 2017. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006351>

MENDOZA, J. C.; VIVAS, D.; RODRÍGUEZ, E.; INGA, R.; SANDOVAL, G.; LAZO, F.; Eficacia Experimental de Anticuerpos IgY Producidos en Huevos, Contra el Veneno de la Serpiente Peruana *Bothrops atrox*, **Rev. Peru. Med. Exp. Salud Publica** v. 29 p. 69–75, 2012. <https://doi.org/10.1590/S1726-46342012000100010>

MERCANTE, L. A., SCAGION, V. P., MIGLIORINI, F. L., MATTOSO, L. H. C., CORREA, D. S., **TrAC Trends Anal. Chem.** v.91, p.91-103, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2017.04.004>

MIN, J. H.; WILDER, C.; AOKI, J.; ARAI, H.; INOUE, K.; PAUL, H.; LGELB, M. M.H. Platelet-activating factor acetylhydrolases: broad substrate specificity and lipoprotein binding does not modulate the catalytic properties of the plasma enzyme, **Biochemistry**. v. 40 p. 4539–4549, 2001. <https://doi.org/10.1021/bi002600g>

MIRANDA, J. C.; REIS, E.; SCHRIEFER, A.; GONCALVES, M.; REIS, M.G.; MITTAL, S., KAUR, H., GAUTAM, N., MANTHA, A. K., **Biosens. Bioelectron.** v.88, p.217-231, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2016.08.028>

MOHAMMADI, J.; MOATTARI, A.; SATTARAHMADY, N.; PIRBONYEH, N.; YADEGARI, H.; HELI, H. Electrochemical biosensing of influenza A subtype genome based on meso/macroporous cobalt (II) oxide nanoflakes-applied to human samples, **Anal. Chim. Acta** v.979, p.51-57, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2017.05.010>

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, p. 2898–2912, 2008. <https://doi.org/10.1007/s00018-008-8113-3>

MONTOYA, J. G., AND LIESENFELD, O. Toxoplasmosis. **Lancet**. v.363, p.1965–1976, 2004. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(04\)16412-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(04)16412-X)

MOOLENAAR, W.H.; KRANENBURG, O.; POSTMA, F.R.; ZONDAG, G.C.M.; Lysophosphatidic acid: G-protein signalling and cellular responses, **Curr. Opin. Cell Biol.** v.9, p.168–173, 1997. [https://doi.org/10.1016/S0955-0674\(97\)80059-2](https://doi.org/10.1016/S0955-0674(97)80059-2)

MOOLENAAR, W.H.; VAN MEETEREN, L.A; GIEPMANS, B.N.G. The ins and outs of lysophosphatidic acid signaling, **BioEssays** v. 26, p.870–881, 2004. <https://doi.org/10.1002/bies.20081>

MORRISON DA, HÖGLUND J. Testing the hypothesis of recent population expansions in nematode parasites of human-associated hosts. **Heredity (Edinb)**. v. 94 p. 426–434, 2005. <https://doi.org/10.1038/sj.hdy.6800623>

MOURA, M. A.; AMENDOEIRA, M. R.; BARBOSA, H. S. Primary culture of intestinal epithelial cells as a potencial model for *Toxoplasma gondii* enteric cycle studies.

Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Brasil, v. 104, p. 862-864, 2009.
<https://doi.org/10.1590/S0074-02762009000600007>

MOUSSA, I.; ASHGAN, M.; ALEISA, A.M.; AL-ARFAJ, A.A.; REJAIE, S.A.; Evaluation of the protective efficacy of immunoglobulin Y (IgY-antibodies) prepared against *Walterinnesia aegyptia* snake venom in Saudi Arabia, *Afr. J. Biotechnol.* v.11, p.13726–13731, 2012. <https://doi.org/10.5897/AJB12.2164>

MURAKAMI, M.; SATO, H.; MIKI, Y.; YAMAMOTO, K.; TAKETOMI, Y.; A new era of secreted phospholipase A₂. *J Lipid Res* v. 56 p. 1248–1261, 2015.
<https://doi.org/10.1194/jlr.R058123.1015.1.test>

MURAKAMI, M.; TAKETOMI, Y.; MIKI, Y.; SATO, H.; HIRABAYASHI, T.; YAMAMOTO, K.; Recent progress in phospholipase A₂ research: from cells to animals to humans. *Prog Lipid Res* v. 50 p. 152–192, 2011.
<https://doi.org/10.1016/j.plipres.2010.12.001>

MURAKAMI, M.T.; VIÇOTI, M.M.; ABREGO, J.R.B.; LOURENZONI, M.R.; CINTRA, A.C.O.; ARRUDA, E.Z. Interfacial surface charge and free accessibility to the PLA₂-active site-like region are essential requirements for the activity of Lys49 PLA₂ homologues, *Toxicon*, v.49, p. 378–387, 2007.
<https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2006.10.011>

NAVARRO, D.; VARGAS, M.; HERRERA, M.; SEGURA, Á.; GÓMEZ, A.; VILLALTA, M.; RAMÍREZ, N.; WILLIAMS, D.; GUTIÉRREZ, J.M.; LEÓN, G.; Development of a chicken-derived antivenom against the taipan snake (*Oxyuranus scutellatus*) venom and comparison with an equine antivenom, *Toxicon*. v.120, p.1–8, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2016.06.018>

NAVES DE SOUZA, D.L.; GOMES, M.S.R.; FERREIRA, F.B.; RODRIGUES, R.S.; ACHÊ, D.C.; RICHARDSON, M.; BORGES, M.H.; RODRIGUES, V.M. Biochemical and enzymatic characterization of BpMP-I, a fibrinogenolytic metalloproteinase

isolated from *Bothropoides pauloensis* snake venom, **Comp. Biochem. Physiol. B** v.161, p.102–109, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2011.10.002>

NAZARI-VANANI, R.; SATTARAHMADY, N.; YADEGARI, H.; DELSHADI, N.; HATAM, G.R.; HELI, H. Electrochemical quantitation of *Leishmania infantum* based on detection of its kDNA genome and transduction of non-spherical gold nanoparticles. **Analytica Chimica Acta.** v.1041, p.40-49, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2018.08.036>

NEELY, M.N., GHANNOUM, M.A. The exciting future of antifungal therapy. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.** v.19, p. 897–914, 2000. <https://doi.org/10.1007/s100960000395>

NETO, S.Y.; SOUTO, D.E. P; DE ANDRADE, H.M.; LUZ, R.D.C. S; KUBOTA, L.T.; DAMOS, F.S. Visible LED light driven photoelectroanalytical detection of antibodies of visceral leishmaniasis based on electrodeposited CdS film sensitized with Au nanoparticles, **Sens. Actuators.** v.256, 682-690, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2017.09.202>

NI, Z.; OKELEY, N. M.; SMART, B. P.; GELB, M. H.; Intracellular actions of group IIA secreted phospholipase A₂ and group IVA cytosolic phospholipase A₂ contribute to arachidonic acid release and prostaglandin production in rat gastric mucosal cells and transfected human embryonic kidney cells. **J Biol Chem** v. 281 p. 245–255, 2006. <https://doi.org/10.1074/jbc.M513874200>

NIEVES, E; PIMENTA, PFP. Development of *Leishmania (Viannia) Braziliensis* and *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in the sandfly *Lutzomyia migonei* (Diptera: Psychodidae). **Journal of Medical Entomology.** v.37, p.134-140, 2000. <https://doi.org/10.1603/0022-2585-37.1.134>

NI EWERTH, M.; KORTING, H. C. Phospholipases of *Candida albicans*. **Mycoses.** v. 44, n. 9-10, p.361-367, 2001. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0507.2001.00685.x>

NILIUS, M.; MALFERTHEINER, P.; *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, v. 10, p. 65–71, 1996. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2036.1996.22164007.x>

NISHIKAWA, Y.; ZHANG, H.; IBRAHIM, H. M.; UI, F.; OGISO, A.; XUAN, X. Construction of *Toxoplasma gondii* bradyzoite expressing the green fluorescent protein. **Parasitology International**, v. 57, p. 219-222, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2007.10.004>

NOK, A. J.; ESIEVO, K. A. N.; IBRAHIM, S.; UKOHA, A. I.; IKEDIOBI, C. O. “Phospholipase A₂ from *Trypanosoma congolense*: characterization and haematological properties,” **Cell Biochemistry and Function**, v. 11, p. 125–130, 1993. <https://doi.org/10.1002/cbf.290110208>

NOLAN, S.J.; ROMANO, J.D.; COPPENS, I. Host lipid droplets: An important source of lipids salvaged by the intracellular parasite *Toxoplasma gondii*. **PLoS Pathog.** v.13, p.e1006362, 2017. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006362>

NOVOSELOV, S. V.; LOBANOV, A. V.; HUA, D.; KASAIKINA, M.V.; HATFIELD, D.L.; GLADYSHEV, V. N.; A highly efficient form of the selenocysteine insertion sequence element in protozoan parasites and its use in mammalian cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, p. 7857–7862, 2007. <https://doi.org/10.1073/pnas.0610683104>

NUNES, D.C.; FIGUEIRA, M.M.; LOPES, D.S.; DE SOUZA, D.L.; IZIDORO, L.F.; FERRO, E.A.; SOUZA, M.A.; RODRIGUES, R.S.; RODRIGUES, V.M.; YONEYAMA, K.A. BnSP-7 toxin, a basic phospholipase A₂ from *Bothrops pauloensis* snake venom, interferes with proliferation, ultrastructure and infectivity of *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. **Parasitology**, v. 140, p.844-54, 2013. <https://doi.org/10.1017/S0031182013000012>

NÚÑEZ, C. E.; ANGULO, Y.; LOMONTE, B. Identification of the myotoxic site of the Lys49 phospholipase A₂ from *Agkistrodon piscivorus piscivorus* snake venom: synthetic C-terminal peptides from Lys49, but not from Asp49 myotoxins, exert

membrane-damaging activities. **Toxicon**. v. 39, p. 1587-1594, 2001. [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(01\)00141-6](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(01)00141-6)

OKABE, A.; SHIMIZU, T.; & HAYASHI, H.; **Biochemical and Biophysical Research Communication**, 160, 33–39, 1989. [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(89\)91616-1](https://doi.org/10.1016/0006-291X(89)91616-1)

OLIVEIRA, C. F.; LOPES, D. S.; MENDES, M. M.; HOMSI-BRANDEBURGO, M.I.; HAMAGUCHI, A.; ALCÂNTARA, T.M.; CLISSA, P. B.; V. M RODRIGUES. Insights of local tissue damage and regeneration induced by BnSP-7, a myotoxin isolated from *Bothrops (neuwiedi) pauloensis* snake venom. **Toxicon** v.53, p.560–569, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2008.12.025>

OLIVEIRA, D.A.; RODOVALHOA, V.R.; FLAUZINO, J.M.R.; DA SILVA, H.S.; ARAUJO, G.R.; VAZ, E.R.; VIEIRA, C.U.; MADURRO, J.M.; MADURRO, A.G.B. Serological Electrodection of Rheumatoid Arthritis Using Mimetic Peptide. **Protein & Peptide Letters**, v.25, p.878-883, 2018. <https://doi.org/10.2174/0929866525666180917161931>

OLIVEIRA, F. C. R.; COSTA, A. J.; SABATINI, G. A. Clínica e hematologia de *Bos indicus*, *Bos taurus* e *Bubalus bubalis* inoculados com oocistos de *Toxoplasma gondii* (Apicomplexa: Toxoplasmatinae). **Ciência Rural**, v. 31, p. 621-626, 2001. <https://doi.org/10.1590/S0103-84782001000400010>

OLIVEIRA, R.M.L.; VIEIRA, S.N.; ALVES, H.C.; FRANCA, E.G.; FRANCO, D.L.; FERREIRA, L.F.; BRITO-MADURRO, A.G.; MADURRO, J.M., Electrochemical and morphological studies of an electroactive material derived from 3-hydroxyphenylacetic acid: A new matrix for oligonucleotide hybridization. **J. Mater. Sci.** v.45, p.475-482, 2010. <https://doi.org/10.1007/s10853-009-3964-z>

OPPERDOES, F. R.; VAN ROY, J. “The phospholipases of *Trypanosoma brucei* bloodstream forms and cultured procyclics,” **Molecular and Biochemical**

Parasitology, vol. 5, no. 5, pp. 309– 319, 1982. [https://doi.org/10.1016/0166-6851\(82\)90038-X](https://doi.org/10.1016/0166-6851(82)90038-X)

OWNBY, C. L.; SELISTRE DE ARAUJO, H. S.; WHITE, S. P.; FLETCHER, J. E. Lysine 49 phospholipase A₂ proteins. **Toxicon**, v. 37, p. 411-445, 1999. [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(98\)00188-3](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(98)00188-3)

PAN, H.; LIU, X. L.; OU-YANG, L. L.; YANG, G. Z.; ZHOU, Y. C.; LI, Z. P.; WU, X. F.; Diversity of cDNAs encoding phospholipase A₂ from *Agkistrodon halys* Pallas venom, and its expression in *E. coli*. **Toxicon** v. 36, p. 1155–1163. 1998. [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(98\)00013-0](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(98)00013-0)

PAPPAS, G.; ROUSSOS, N.; FALAGAS, M. E.; Toxoplasmosis snapshots: Global status of *Toxoplasma gondii* seroprevalence and implications for pregnancy and congenital toxoplasmosis. **Int. J. Parasitol.** v. 39, p.1385–1394, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2009.04.003>

PARMA, Y.R.; CHACANA, P.A.; ROGÉ, A. KAHL, A. CANGELOSI, A.; GEOGHEGAN, P.; LUCCHESI, P.M.A.; FERNÁNDEZ-MIYAKAWA, M.E. Antibodies anti-Shiga toxin 2 B subunit from chicken egg yolk: isolation, purification and neutralization efficacy. **Toxicon**, n.58, n.4, p.380-388, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2011.07.009>

PARTHASARATHY, P., VIVEKANANDAN, S., **World Rev. Sci. Technol. Sustain.** v.14, 52-71, 2018. <https://doi.org/10.1504/WRSTSD.2018.10013891>

PASSERO, L. F. D.; LAURENTI, M. D.; TOMOKANE, T. Y.; CORBETT, C. E. P.; AND TOYAMA, M. H.; The effect of phospholipase A₂ from *Crotalus durissus collilineatus* on *Leishmania (Leishmania) amazonensis* infection. **Parasitology Research** v. 102, p. 1025–1033, 2008. <https://doi.org/10.1007/s00436-007-0871-6>

PATTERSON, R.; YOUNGNER, J.S.; WEIGLE, WO.; DIXON, F.J. The metabolism of serum proteins in the hen and chick and secretion of serum proteins by the ovary

of the hen. **The Journal of General Physiology** v.45, p.501–513, 1962.
<https://doi.org/10.1085/jgp.45.3.501>

PAWLOWIC, M. C.; ZHANG, K. *Leishmania* parasites possess a platelet-activating factor acetylhydrolase important for virulence, **Molecular & Biochemical Parasitology**. v.186, p.11–20, 2012.
<https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2012.08.005>

PEI, J.; COLLISSON, E.W. Specific antibodies secreting cells from chickens can be detected by three days and memory B cells by three weeks post-infection with the avian respiratory coronavirus. **Dev. Comp. Immunol.** v.29, p.153–160, 2005.
<https://doi.org/10.1016/j.dci.2004.06.009>

PEREIRA, A.C.A; SILVA, R.J.S.; FRANCO, P.S.F; GOMES, A.O; SOUZA, G.; ILIANA MILIAN, I.C.B.; RIBEIRO, M.; ROSINI, A.M.; GUIRELLI, P.M.; RAMOS, E.L.P.; MINEO, T.W.P.; MINEO, J.R.; SILVA, N.M.; FERRO, E.A.V.; BARBOSA, B.F. Cyclooxygenase (COX)-2 Inhibitors Reduce *Toxoplasma gondii* Infection and Upregulate the Pro-inflammatory Immune Response in *Calomys callosus* Rodents and Human Monocyte Cell Line. **Frontiers in Microbiology**, v.10, 2019.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00225>

PEREIRA, E.P.V.; VAN TILBURG, M.F.; FLOREAN, E.O.P.T.; GUEDES, M.I.F. Egg yolk antibodies (IgY) and their applications in human and veterinary health: A review. **International Immunopharmacology**. v.73, p.293–303, 2019.
<https://doi.org/10.1016/j.intimp.2019.05.015>

PETAN, T.; KRIZAJ, I.; PUNGERCAR, J. Restoration of enzymatic activity in a Ser-49 phospholipase A₂ homologue decreases its Ca²⁺-independent membrane-damaging activity and increases its toxicity. **Biochemistry** v. 46, p. 12795–12809, 2007. <https://doi.org/10.1021/bi701304e>

PINON, J.M.; DUMON, H.; CHEMLA, C.; FRANCK, J.; PETERSEN, E.; LEBECH, M.; ZUFFEREY, J.; BESSIERES, M. H.; MARTY, P.; HOLLIMAN, R.; JOHNSON,

J.; LUYASU, V.; LECOLIER, B.; GUY, E.; JOYNSON, D.H.M.; DECOSTER, A.; ENDERS, G.; PELLOUX, H.; CANDOLFI, E. Strategy for Diagnosis of Congenital Toxoplasmosis: Evaluation of Methods Comparing Mothers and Newborns and Standard Methods for Postnatal Detection of Immunoglobulin G, M, and A Antibodies. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, p.2267–2271, 2001. <https://doi.org/10.1128/JCM.39.6.2267-2271.2001>

POLGAR, J.; MAGNENAT, E. M.; PEITSCH, M. C.; WELLS, T. N. C.; CLEMETSON, K. J. Asp-49 is not an absolute prerequisite for the enzymic activity of low-M(r) phospholipases A₂: purification, characterization and computer modelling of an enzymically active Ser-49 phospholipase A₂, ecarpholin S, from the venom of *Echis carinatus sochureki* (saw-scaled viper). **Biochem. J.** v. 319, p. 961–968, 1996. <https://doi.org/10.1042/bj3190961>

POLLOK, R. C. G.; MCDONALD, V.; KELLY, P.; Farthing, “The role of *Cryptosporidium parvum*-derived fosfolipase in intestinal epithelial cell invasion,” **Parasitology Research**, v. 90 p. 181–186, 2003. <https://doi.org/10.1007/s00436-003-0831-8>

POLSON, A.; VON WECHMAR, M. B.; FAZAKERLEY, G.; Antibodies to proteins from yolk of immunized hens, **Immunol. Commun.** v. 9 p. 495–514, 1980. <https://doi.org/10.3109/08820138009066011>

PRESCOTT, S. M.; ZIMMERMAN, G. A.; STAFFORINI, D. M.; MCINTYRE, T. M.; Platelet-activating factor and related lipid mediators, **Annu. Rev. Biochem.** v. 69 p. 419–445, 2000. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.69.1.419>

PSZENNY, V.; EHRENMAN, K.; ROMANO, J.D.; KENNARD, A.; SCHULTZ, A.; ROOS, D.S.; GRIGG, M.E.; CARRUTHERS, V.B.; COPPENS, I. Secreted by *Toxoplasma* Facilitates Parasite Replication and Egress. **The journal of biological chemistry**, v. 291, pp. 3725–3746, 2016. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.671974>

QU, J.X.; LIN, Y.H; MA, R.S.; WANG, H. Immunoaffinity purification of polypeptide proteins against *Plasmodium falciparum* with chicken IgY specific to their C-terminal epitope tag. **Protein Expression and Purification**, v.75, n.2, p.225-229, 2011.

<https://doi.org/10.1016/j.pep.2010.10.003>

QUACH, N.D., ARNOLD, R.D., CUMMINGS, B.S. Secretory phospholipase A₂ enzymes as pharmacological targets for treatment of disease. **Biochem. Pharmacol.** v.90, p.338–348, 2014.

<https://doi.org/10.1016/j.bcp.2014.05.022>

RADKE, J. R.; DONALD, R. G.; EIBS, A.; JEROME, M. E.; BEHNKE, M. S.; RAHI, A.; SATTARAHMADY, N.; HELI, H. Zepto-molar electrochemical detection of Brucella genome based on gold nanoribbons covered by gold nanoblossoms, **Sci.Rep.** v.5, p.18060, 2015.

<https://doi.org/10.1038/srep18060>

RAHI, A.; KARIMIAN, K.; HELI, H. Nanostructured materials in electroanalysis of pharmaceuticals, **Anal. Biochem.** v.497, p.39-47, 2016.

<https://doi.org/10.1016/j.ab.2015.12.018>

RAHMAN, S.; NGUYEN, S. V.; ICATLO JR, F.; CUMEDA, K.; KODAMA, Y.; Oral passive IgY based immunotherapeutics: a novel solution for prevention and treatment of alimentary tract diseases, **Hum. Vaccin. Immunother.** v.9 p.1039–1048, 2013.

<https://doi.org/10.4161/hv.23383>

RAMANADHAM, S.; ALIM T.; ASHLEY, J. W.; BONE, R. N.; HANCOCK, W. D.; LEI, X.; Calcium-independent phospholipases A₂ and their roles in biological processes and diseases. **J Lipid Res.** v. 56 p.1643–1668, 2015.

<https://doi.org/10.1194/jlr.R058701>

RAMÍREZ, N.; SALGADO, A. M.; VALDMAN, B.; The evolution and developments of immunosensors for health and environmental monitoring: problems and perspectives. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 26, p. 227–249, 2009.

<https://doi.org/10.1590/S0104-66322009000200001>

RAMRAKHIANI, L.; CHAND, S. Recent Progress on Phospholipases: Different Sources, Assay Methods, Industrial Potential and Pathogenicity. **Appl Biochem Biotechnol.** v.164, p.991–1022, 2011. <https://doi.org/10.1007/s12010-011-9190-6>

RESENDE, L.O.; CASTRO, A.C.H.; ANDRADE, A.O.; MADURRO, J.M.; BRITOMADURRO, A.G. Immunosensor for electro detection of the Creactive protein in serum. **J. Solid State Electrochem.** v.22, p.1365-1372, 2018. <https://doi.org/10.1007/s10008-017-3820-z>

RIAZ, A.; HUANG, Y.; JOHANSSON, S. G-protein-coupled lysophosphatidic acid receptors and their regulation of AKT signaling, **Int. J. Mol. Sci.** v.17, 2016. <https://doi.org/10.3390/ijms17020215>

RICCI, F., ADORNETTO, G.; PALLESCHI, G. A review of experimental aspects of electrochemical immunosensors. **Electrochimica Acta**, v. 84, p. 74–83, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2012.06.033>

RICHMOND, G. S.; SMITH, T. K. “The role and characterization of phospholipase A₁ in mediating lysophosphatidylcholine synthesis in *Trypanosoma brucei*,” **Biochemical Journal**, vol. 405, no. 2, pp. 319–329, 2007. <https://doi.org/10.1042/BJ20070193>

RICHMOND, G. S.; SMITH, T. K.; “A novel phospholipase from *Trypanosoma brucei*,” **Molecular Microbiology**, v. 63, p. 1078–1095, 2007. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05582.x>

ROCHA-GASO, M.-I., VILLARREAL-GÓMEZ, L.-J., BEYSSEN, D., SARRY, F., REYNA, M.-A., IBARRA-CERDEÑA, C.-N., **Sensors**, v.17, 2017. <https://doi.org/10.3390/s17112629>

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

biological activity. **Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.** v. 121, p. 215-22, 1998. [https://doi.org/10.1016/S1095-6433\(98\)10136-8](https://doi.org/10.1016/S1095-6433(98)10136-8)

RODRIGUES, L.P.; FERREIRA, L.F.; DO MONTE, A.F.G.; BRITO-MADURRO, A.G.; MADURRO, J.M. Bioelectrode applied to diagnosis of cardiac disease. **J. Nanosci. Nanotechnol.** v.14, p.6528-6538, 2014. <https://doi.org/10.1166/jnn.2014.9369>

RODRIGUES, R. S.; BOLDRINI-FRANCA, J.; FONSECA, F. P.; DE LA TORRE, P.; HENRIQUE-SILVA, P. F.; SANZ, L.; CALVETE, J. J.; RODRIGUES, J. J. V. M.; Combined snake venomomics and venom gland transcriptomic analysis of *Bothropoides pauloensis*. **J. Proteomics**, v. 75 p. 2707-2720, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2012.03.028>

RODRIGUES, V. M.; LOPES, D.S.; CASTANHEIRA, L.E.; GIMENES, S.N. C.; DE SOUZA, D.L. N.; ACHÊ, D.C.; BORGES, I.P.; YONEYAMA, K.A.G.; RODRIGUES, R.S. *Bothrops pauloensis* Snake Venom Toxins: The Search for New Therapeutic Models. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 15, p. 670-684, 2015. <https://doi.org/10.2174/1568026615666150217120347>

RODRIGUES, V.M.; SOARES, A.M.; MANCIN, A.C.; FONTES, M.R.; HOMSI BRANDEBURGO, M.I.; GIGLIO, J.R. Geographic variations in the composition of myotoxins from *Bothrops neuwiedi* snake venoms: biochemical characterization and biological activity, **Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.** v.121 p.215–222, 1998. [https://doi.org/10.1016/S1095-6433\(98\)10136-8](https://doi.org/10.1016/S1095-6433(98)10136-8)

ROSE, M.E; ORLANS, E.; BUTTRESS, N. Immunoglobulin classes in the hen's egg: their segregation in yolk and white. **European Journal of Immunology** v.4, p.521–523, 1974. <https://doi.org/10.1002/eji.1830040715>

ROSENSON, R.S.; HURT-CAMEJO, E. Phospholipase A₂ enzymes and the risk of atherosclerosis, **Eur. Heart J.** v.33, p.2899–2909, 2012. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehs148>

ROSS, R.; note on the bodies recently described by leishman and donovan. **BR MED J.** v. 2 p. 1261-1262, 1903. <https://doi.org/10.1136/bmj.2.2237.1261>

RUFINI, S. Calcium ion independent membrane leakage induced by phospholipase-like myotoxins. **Biochemistry**, v. 31, n. 49, p.12424-12430, 1992. <https://doi.org/10.1021/bi00164a018>

SAFFER, L. D.; LONG KRUG, S. A.; SCHWARTZMAN, J. D.; The role of phospholipase in host cell penetration by *Toxoplasma gondii*. **Am J Trop Med Hyg** v. 40 p. 145–149, 1989. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1989.40.145>

SAFFER, L. D.; SCHWARTZMAN, J. D.; “A soluble phospholipase of *Toxoplasma gondii* associated with host cell penetration,” *Journal of Protozoology*, v. 38, n. 5, p. 454–460, 1991. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1991.tb04816.x>

SALTO, M. L.; BERTELLO, L. E.; VIEIRA, M.; DOCAMPO, R.; MORENO, S. N. J.; DE LEDERKREMER, R. M. Formation and remodeling of inositolphosphoceramide during differentiation of *Trypanosoma cruzi* from trypomastigote to amastigote. **Eukaryotic Cell**. p.756–768, 2003. <https://doi.org/10.1128/EC.2.4.756-768.2003>

SAMPAIO, L. C. L.; BALDISSERA, M. D.; GRANDO, T.; H.; GRESSLER, L. T.; CAPELETO, D. M.; DE SÁ, M. F.; Production, purification and therapeutic potential of egg yolk antibodies for treating *Trypanosoma evansi* infection, **Vet. Parasitol.** v. 204 p. 96–103, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.05.032>

SATTARAHMADY, N.; MOVAHEDPOUR, A.; HELI, H.; HATAM, G.R.; Gold nanoparticles based biosensing of *Leishmania major* kDNA genome: visual and spectrophotometric detections, **Sensor. Actuator.** v.235, p.723-731, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2016.05.023>

SCHADE, R.; CALZADO, E. G.; SARMIENTO, R.; CHACANA, P. A.; PORANKIEWICZ-ASPLUND, J.; TERZOLO, H. R.; Chicken egg yolk antibodies

(IgY-technology): a review of progress in production and use in research and human and veterinary medicine. **Altern Lab Anim** v. 33 p. 129–154, 2005. <https://doi.org/10.1177/026119290503300208>

SCHALOSKE; R. H.; DENNIS, E. A.; “The phospholipase A2 superfamily and its group numbering system,” **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1761, n. 11, p. 1246–1259, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2006.07.011>

SCHLEIN, Y.; Leishmania and Sandflies: Interactions in the life cycle and transmission. **Parasitol Today**. v. 9 p. 255-258, 1993. [https://doi.org/10.1016/0169-4758\(93\)90070-V](https://doi.org/10.1016/0169-4758(93)90070-V)

SCHULTZ, A.J.; CARRUTHERSA, V.B. *Toxoplasma gondii* LCAT Primarily Contributes to Tachyzoite Egress. **Host-Microbe Biology**. v. 3, p-10-18, 2018. <https://doi.org/10.1128/mSphereDirect.00073-18>

SCHWARZKOPF, C.; STAAK, C.; BEHN, I.; ERHARD, M.; SCHADE, R.; BEHN, I.; ERHARD, M.; HLINAK, A.; STAAK, C.; (Eds.), Chicken Egg Yolk Antibodies, Production and Application, IgY-Technology, **Springer-Verlag**, p. 25–64, 2001. https://doi.org/10.1007/978-3-662-04488-9_3

SCOTT, D.L.; WHITE, S.P.; OTWINOWSKI, Z.; YUAN, W.; GELB, M.H.; SIGLER, P.B. Interfacial catalysis: the mechanism of phospholipase A₂. **Science**. v.250 p.1541–1546, 1990. <https://doi.org/10.1126/science.2274785>

SHAW, J. J.; Further thoughts on the use of name *Leishmania (leishmania) infantum* chagasi for the aetiological agent of visceral leishmaniasis. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. v. 101 p. 577-579, 2006. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762006000500017>

SHUAIBU, M. N.; KANBARA, H.; YANAGI, T.; AMEH, D. A.; BONIRE, J. J.; NOK, A. J. “Phospholipase A₂ from *Trypanosoma brucei* gambiense and *Trypanosoma brucei brucei*: Inhibition by organotin,” **Journal of Enzyme Inhibition**, v. 16, no. 5, pp. 433–441, 2001. <https://doi.org/10.1080/14756360109162392>

SIFI, A.; ADI-BESSALEM, S.; LARABA-DJEBARI, F. Development of a new approach of immunotherapy against scorpion envenoming: Avian IgYs an alternative to equine IgGs. **International Immunopharmacology**. v.61 p.256–265, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2018.06.013>

SILVA, A. V.; CUNHA, E. L. P.; MEIRELES, L. R. Toxoplasmose em ovinos e caprinos: estudo soropidemiológico em duas regiões do Estado de Pernambuco, Brasil. **Ciência Rural**, v. 33, p. 115- 119, 2003. <https://doi.org/10.1590/S0103-84782003000100018>

SILVA, T.A.R.; FERREIRA, L. F. SOUZA, L.M.; GOULART, L.R.; MADURRO, J.M.; BRITO-MADURRO, A.G. New approach to immobilization and specific-sequence detection of nucleic acids based on poly(4-hydroxyphenylacetic acid). **Materials Science and Engineering: C**, v. 29, n. 2, p. 539–545, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2008.09.048>

SILVA, T.A.R.; FERREIRA, L.F.; BOODTS, J.F.C.; EIRAS, S.P.; MADURRO, J.M.; BRITO-MADURRO, A.G. Poly(4-hydroxyphenylacetic acid): A new material for immobilization of biomolecules. **Polym. Eng. Sci.** v.48, p.1963-1970, 2008. <https://doi.org/10.1002/pen.21026>

SILVA, T.A.R.; FERREIRA, L.F.; SOUZA, L.M.; GOULART, L.R. MADURRO, J.M.; BRITO-MADURRO, A.G. New approach to immobilization and specific-sequence detection of nucleic acids based on poly(4-hydroxyphenylacetic acid). **Mater. Sci. Eng.** v.29, p.539-545, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2008.09.048>

SINGER, W. D., BROWN, H. A., STERNWEIS, P. C. **Annual Review Biological Chemistry** v. 66 p. 475–509, 1997. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.66.1.475>

SIX, D. A.; DENNIS, E. A.; The expanding superfamily of phospholipase A₂ enzymes: classification and characterization, **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1488 p. 1-19, 2000. [https://doi.org/10.1016/S1388-1981\(00\)00105-0](https://doi.org/10.1016/S1388-1981(00)00105-0)

SKARIAH, S.; McINTYRE, M. K.; MORDUE, D. G.; Toxoplasma gondii: determinants of tachyzoite to bradyzoite conversion. **Parasitol. Res**, v. 107, p. 253-260, 2010. <https://doi.org/10.1007/s00436-010-1899-6>

SMITH, J. B.; SILVER, M. J.; WEBSTER, G. R. Phospholipase A₁ of human blood platelets (Short Communication). **Biochemical Journal**, v. 131, n. 3, p.615-618, 1973. <https://doi.org/10.1042/bj1310615>

SMITH, T. K.; MILNE, F. C.; SHARMA, D. K.; CROSSMAN, A.; BRIMACOMBE, J.S.; FERGUSON, M.A.J. Early steps in glycosylphosphatidylinositol biosynthesis in *Leishmania major*. **Biochem. J.** v.326, p.393-400, 1997. <https://doi.org/10.1042/bj3260393>

SNIJDER, H. J.; DIJKSTRA, B. W.; “Bacterial phospholipase A: structure and function of an integral membrane phospholipase,” **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1488 p. 91–101, 2000. [https://doi.org/10.1016/S1388-1981\(00\)00113-X](https://doi.org/10.1016/S1388-1981(00)00113-X)

SOARES, A.M., FONTES, M.R.M., GIGLIO, J.R. Phospholipases A₂ myotoxins from *Bothrops* snake venoms: structure–function relationship. **Curr. Org. Chem.** v. 8, p. 1677–1690, 2004. <https://doi.org/10.2174/1385272043369610>

SOARES, A.M.; GUERRA-SÁ R.; BORJA-OLIVEIRA, C.R.; RODRIGUES, V.M.; RODRIGUES-SIMIONI L.; RODRIGUES, V.; FONTES M.R.; LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J.M., GIGLIO, J.R. Structural and functional characterization of BnSP-7, a Lys49 myotoxic phospholipase A₂ homologue from *Bothrops neuwiedi pauloensis* venom. **Arch Biochem Biophys**, v. 378, p. 201-209, 2000. <https://doi.org/10.1006/abbi.2000.1790>

SONG, Y.; LUO, Y.; ZHU, C.; LI, H.; DU, D.; LIN, Y. Recent advances in electrochemical biosensors based on graphene two-dimensional nanomaterials.

Biosens. Bioelectron. v.76, p.195–212, 2016.
<https://doi.org/10.1016/j.bios.2015.07.002>

SONODA, H.; AOKI, J.; HIRAMATSU T.; “A novel phosphatidic acid-selective phospholipase A1 that produces lysophosphatidic acid,” **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, p. 34254–34263, 2002. <https://doi.org/10.1074/jbc.M201659200>

SOUTO, D.E.P.; SILVA, J.V.; MARTINS, H.R.; REIS, A.B.; LUZ, R.C.S.; KUBOTA, L.T.; DAMOS, F.S. Development of a label-free immunosensor based on surface plasmon resonance technique for the detection of anti-Leishmania infantum antibodies in canine serum, **Biosens. Bioelectron.** v.46, p.22-29, 2013.
<https://doi.org/10.1016/j.bios.2013.01.067>

STEFANO, A.S.; MANNUCCI, L.; TAMBURI, F.; CARDILLO, C.; SCHINZARI, F.; ROVELLA, V.; NISTICÒ, S.; BENNARDO, L.; DANIELE, N.D.; TESAURO, M. Lp-PLA₂, a new biomarker of vascular disorders in metabolic diseases. **International Journal of Immunopathology and Pharmacology.** v.33, p.1–4, 2019.
<https://doi.org/10.1177/2058738419827154>

STEPHENS, W. W.; WALKER, J. L.; MYERS, W. J.; *Pathol. Bacteriol.* v. 5 p. 279-301, 1898. <https://doi.org/10.1002/path.1700050307>

STROBER, W.; Trypan blue exclusion test of cell viability. *Curr. Protoc. Immunol.* **Appendix 3B** v. 3 p.2, 2001. <https://doi.org/10.1002/0471142735.ima03bs21>

SUI, J.; CAO, L.; LIN, H.; Antibacterial activity of egg yolk antibody (IgY) against SUNDBERG, E.J; MARIUZZA, R.A. Antibody structure and recognition of antigen. In: Honjo AFT, Neuberger M, editor. **Molecular Biology of B Cells.** Elsevier Science (USA). p. 491–509, 2004. <https://doi.org/10.1016/B978-012053641-2/50032-0>

SUNNWOO, H. H. IgY antibody-based method for preventing and monitoring food pathogens. In R. R. Watson, & F. de Meester (Eds.). *Handbook of eggs in human*

function. Wageningen The Netherlands: Wageningen Academic Publishers. p. 641–655, 2015. https://doi.org/10.3920/978-90-8686-804-9_35

TENTER, A. M.; HECKEROTH, A. R.; WEISSM L. M.; *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. **Int J Parasitol.** v. 30 p. 1217–1258, 2000. [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(00\)00124-7](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(00)00124-7)

TENTER, A. M.; *Toxoplasma gondii* in animals used for human consumption. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Brasil, v. 104, n.2, p. 364-369, 2009. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762009000200033>

TEO, C.F.; ZHOU, X.W.; BOGYO, M.; CARRUTHERS, V.B. Cysteine protease inhibitors block *Toxoplasma gondii* microneme secretion and cell invasion, **Antimicrob. Agents Chemother.** v.51, p.679–688, 2007. <https://doi.org/10.1128/AAC.01059-06>

TIWARI, I.; SINGH, M.; PANDEY, C.M.; SUMANA, G. Electrochemical genosensor based on graphene oxide modified iron oxide–chitosan hybrid nanocomposite for pathogen detection. **Sens. Actuators B Chem.** v.206, 276–283, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2014.09.056>

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

TSAI, I.H.; WANG, Y. M.; CHEN, Y. H.; TSAI, T. S.; TU, M. C.; Venom phospholipases A₂ of bamboo viper (*Trimeresurus stejnegeri*): molecular characterization, geographic variations and evidence of multiple ancestries. **Biochem. J.** v. 377 p. 215–223, 2004. <https://doi.org/10.1042/bj20030818>

TSUBOI, K.; SUGIMOTO, A.; ICHIKAWA, Y.; Prostanoid receptor subtypes, Prostaglandins Other Lipid Mediators. v. 68–69 p. 535–556, 2002. [https://doi.org/10.1016/S0090-6980\(02\)00054-0](https://doi.org/10.1016/S0090-6980(02)00054-0)

URBINA, J. A.; “Specific chemotherapy of Chagas disease: relevance, current limitations and new approaches,” **Acta Tropica**, v. 115, n. 1-2, p. 55–68, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2009.10.023>

VAN REGENMORTEL, M.H. Antigenicity and immunogenicity of synthetic peptides. **Biologicals**. v.29, p.209-213, 2001. <https://doi.org/10.1006/biol.2001.0308>

VARADI, L.; LUO, J.L.; HIBBS, D.E.; PERRY, J.D.; ANDERSON, R.J.; ORENGA, S.; GROUNDWATER, P.W. Methods for the detection and identification of pathogenic bacteria: past, present, and future, **Chem. Soc. Rev.** v.46, p.4818-4832, 2017. <https://doi.org/10.1039/C6CS00693K>

VILIBIC-CAVLEK, T.; BARBIC, L.; STEVANOVIĆ, V.; PETROVIĆ, G.; MLINARIĆ-GALINOVIĆ, G. IgG avidity: an important serologic marker for the diagnosis of tick-borne encephalitis virus infection, **Pol. J. Microbiol.** v.65, p.119–121, 2016. <https://doi.org/10.5604/17331331.1197285>

VILLALTA, F.; ZHANG, Y.; BIBB, K. E.; BURNS, J. M.; LIMA, M. F.; “Signal transduction in human macrophages by gp83 ligand of *Trypanosoma cruzi*: trypomastigote gp83 ligand up-regulates trypanosome entry through the MAP kinase pathway,” **Biochemical and Biophysical Research Communications**, vol. 249, no. 1, pp. 247–252, 1998. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1998.9127>

WAINSZELBAUM, M.; ISOLA, E.; WILKOWSKY, S.; CANNATA, J. J. B.; FLORIN-CHRISTENSEN, J.; FLORIN-CHRISTENSEN, M.; “Lysosomal phospholipase A1 in *Trypanosoma cruzi*: an enzyme with a possible role in the pathogenesis of Chagas’ disease,” **Biochemical Journal**, v. 355, n. 3, p. 765–770, 2001. <https://doi.org/10.1042/bj3550765>

WAN, Y.; SU, Y.; ZHU, X.; LIU, G.; FAN, C. Development of electrochemical immunosensors towards point of care diagnostics. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 47, p. 1–11, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2013.02.045>

WANG, H.; SHEN, G.; YU, R. Aspects of recent development of immunosensors. In: ZHANG, X.; JU, H.; WANG, J. *Electrochemical Sensors, Biosensors and their Biomedical Applications*. **Academic Press**, p. 237-260, 2008. <https://doi.org/10.1016/B978-012373738-0.50011-8>

WANG, Z., DAI, Z., **Nanoscale**. v.7, p.6420-6431, 2015. <https://doi.org/10.1039/C5NR00585J>

WARD, E. S.; *Immunity* v. 20 p. 507–508, 2004. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(04\)00117-7](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(04)00117-7)

WARD, R.J.; CHIOATO, L.; DE OLIVEIRA, A.H.C.; RULLER, R.; SÁ, J.M. Active-site mutagenesis of a Lys49-phospholipase A₂: biological and membrane-disrupting activities in the absence of catalysis, **Biochem. J.** v.362, p.89–96, 2002. <https://doi.org/10.1042/bj3620089>

WARR, G. W.; MAGOR, K. E.; HIGGINS, D. A.; IgY: clues to the origins of modern antibodies, **Immunol. Today**. v. 16 p. 392–398, 1995. [https://doi.org/10.1016/0167-5699\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/0167-5699(95)80008-5)

WATANABE, L.; SOARES, A.M.; WARD, R.J.; FONTES, M.R.M.; ARNI, R.K. Structural insights for fatty acid binding in a Lys49-phospholipase A₂: crystal structure of myotoxin II from *Bothrops moojeni* complexed with stearic acid, **Biochimie**, v. 87, p.161–167, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2004.11.005>

WEI, J. F.; WEI, X. L.; CHEN, Q. Y.; HUANG, T.; QIAO, L. Y. WANG, W. Y.; XIONG, Y. L.; HE, S. H. N49 phospholipase A₂, a unique subgroup of snake venom group II phospholipase A₂. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1760, p. 462-471, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2005.11.022>

WEISS, L.; DUBEY, J.; Toxoplasmosis: A history of clinical observations. **Int J Parasitol.** v. 39 p. 895–901, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2009.02.004>

WEISS, N.O.; ZHOU, H.; LIAO, L.; LIU, Y.; JIANG, S.; HUANG, Y.; DUAN, X. Graphene: An emerging electronic material. **Adv. Mater.** v.24, p.5782–5825, 2012. <https://doi.org/10.1002/adma.201201482>

WEN, J.; ZHAO, S.; HE, D.; YANG, Y.; LI, Y.; ZHU, S.; Preparation and characterization of egg yolk immunoglobulin Y specific to influenza B virus, **Antivir. Res.** v. 93 p. 154–159, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2011.11.005>

WENG, H.B; CHEN, H.; WANG, M.W. Innovation in neglected tropical disease drug discovery and development. **Infectious Diseases of Poverty** v.7, p.67-70, 2018. <https://doi.org/10.1186/s40249-018-0444-1>

WHITELAW, J. A.; LATORRE-BARRAGAN, F.; GRAS, S.; PALL, GS.; LEUNG, J. M.; HEASLIP, A.; Surface attachment, promoted by the actomyosin system of *Toxoplasma gondii* is important for efficient gliding motility and invasion. **BMC Biol.** v. 15 p. 1–23, 2017. <https://doi.org/10.1186/s12915-016-0343-5>

WILKING, H.; THAMM, M.; STARK, K.; AEBISCHER, T.; SEEBER, F. Prevalence, incidence estimations and risk factors of *Toxoplasma gondii* infection in Germany: a representative, cross-sectional, serological study. **Sci. Rep.** v.6: 2016. <https://doi.org/10.1038/srep22551>

WILSON, S.K.; KNOLL, L.J.; Patatin-like phospholipases in microbial infections with emerging roles in fatty acid metabolism and immune regulation by Apicomplexa. **Mol Microbiol.** v. 107, p.34-36, 2018. <https://doi.org/10.1111/mmi.13871>

WIMLEY, W.C.; WHITE, S.H. Experimentally determined hydrophobicity scale for *Listeria monocytogenes* and preliminary evaluation of its potential for food preservation, **J. Sci. Food Agric.** v. 91 p. 1946–1950, 2011. <https://doi.org/10.1002/jsfa.4381>

WOOLLEY, J.A.; LANDON, J. Comparison of antibody production to human interleukin-6 (IL-6) by sheep and chickens. **Journal of Immunological Methods**, v.178, n.2, p.253-265, 1995. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(94\)00263-V](https://doi.org/10.1016/0022-1759(94)00263-V)

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Leishmaniasis: disease information. [citado 2019 JUNHO]. Disponível em: <https://www.who.int/leishmaniasis/disease/en/>

XU, Y. P.; LI, X. Y.; JIN, L. J.; ZHEN, Y. H.; LU, Y. N.; LI, S. Y.; Application of chicken egg yolk immunoglobulins in the control of terrestrial and aquatic animal diseases: a review, **Biotechnol. Adv.** v. 29 p. 860–868, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.07.003>

YAZAWA, S.; HOSOMI, O.; TAKEYA, A. Isolation and characterization of anti-H antibody from egg yolk of immunized hens. **Immunological Investigations** v.20, p. 569–581, 1991. <https://doi.org/10.3109/08820139109026238>

YUAN, Z.; GAO, S.; LIU, Q.; XIA, X.; LIU, X.; LIU, B.; HU, R. *Toxoplasma gondii* antibodies in cancer patients. **Cancer Letters**, v. 254, p. 71–74, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2007.02.011>

ZHANG, W.W. The use of gene specific IgY antibodies for drug target discovery, **Drug Discov.** v.8, p.364–371, 2003. [https://doi.org/10.1016/S1359-6446\(03\)02655-2](https://doi.org/10.1016/S1359-6446(03)02655-2)

ZHU, C., YANG, G., LI, H., DU, D., LIN, Y. **Anal. Chem.** v.87, 230-249, 2015. <https://doi.org/10.1021/ac5039863>