

**AMANDA LAVIOLA DE ANDRADE**

**DESENVOLVIMENTO DE UM IMUNOENSAIO CROMATOGRÁFICO RÁPIDO DE  
FLUXO LATERAL PARA O DIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE VISCERAL  
CANINA, UTILIZANDO ANTÍGENO RECOMBINANTE OTIMIZADO DE  
*Leishmania infantum***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Orientadora: Juliana Lopes Rangel Fietto

**VIÇOSA - MINAS GERAIS  
2023**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade  
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

A553d  
2023

Andrade, Amanda Laviola de, 1993-  
Desenvolvimento de um imunoenensaio cromatográfico  
rápido de fluxo lateral para o diagnóstico da leishmaniose  
visceral canina utilizando antígeno recombinante otimizado de  
*Leishmania infantum* / Amanda Laviola de Andrade. – Viçosa,  
MG, 2023.

1 dissertação eletrônica (89 f.): il. (algumas color.).

Orientador: Juliana Lopes Rangel Fietto.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa,  
Departamento de Bioquímica e Biologia Celular, 2023.

Referências bibliográficas: f. 84-89.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2023.573>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Análise cromatográfica. 2. Leishmaniose visceral.  
3. Cães - Doenças. I. Fietto, Juliana Lopes Rangel, 1971-  
II. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de  
Bioquímica e Biologia Celular. Programa de Pós-Graduação em  
Bioquímica Aplicada. III. Título.

CDD 22. ed. 543.8


**AMANDA LAVIOLA DE ANDRADE**

**DESENVOLVIMENTO DE UM IMUNOENSAIO CROMATOGRÁFICO RÁPIDO DE FLUXO LATERAL PARA O DIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA, UTILIZANDO ANTÍGENO RECOMBINANTE OTIMIZADO DE *Leishmania infantum***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.


APROVADA: 31 de julho de 2023.

Assentimento:

Documento assinado digitalmente  
 **AMANDA LAVIOLA DE ANDRADE**  
Data: 09/10/2023 22:40:47-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

Amanda Laviola de Andrade  
Autora

Documento assinado digitalmente  
 **JULIANA LOPES RANGEL FIETTO**  
Data: 10/10/2023 08:44:17-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

Juliana Lopes Rangel Fietto  
Orientadora

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, que por sua infinita misericórdia tem direcionado minha caminhada rumo ao crescimento pessoal e profissional;

Ao meu marido Walmir Luiz da Silva que me fortaleceu nessa caminhada, com o seu apoio, companheirismo e amor;

Aos meus pais José Geraldo Soares de Andrade e Maria Aparecida Laviola de Andrade pelo amor, educação, incentivo e exemplos de vida;

A minha irmã Andreza Laviola de Andrade pelo carinho, amizade e sua disposição em sempre me ajudar e aos demais familiares e amigos que direta ou indiretamente contribuíram para a concretização desse propósito;

Aos colegas do LIMA e LBB, pelos conhecimentos e experiências compartilhadas, pela amizade e companheirismo tornando a rotina de trabalho mais agradável;

À minha Orientadora, Professora Juliana Lopes Rangel Fietto, pela confiança e oportunidade de aprendizado e crescimento profissional, pelo incentivo, compreensão e exemplo de dedicação e competência;

As agências de fomento FAPEMIG (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais), AKC (Canine Health Fundação), CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil), código de Doação 001. Este projeto foi financiado pela AKC, o conteúdo desta publicação é de responsabilidade exclusiva dos autores e não representam necessariamente as opiniões da Fundação. As fontes de financiamento não tiveram envolvimento no desenho do estudo, coleta, análise, interpretação dos dados ou redação.

Por fim, Gratidão à Universidade Federal de Viçosa e ao corpo docente e funcionários do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular e do Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO), por todos os aprendizados e oportunidades que me proporcionaram essa conquista;

## RESUMO

ANDRADE, Amanda Laviola, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2023. **Desenvolvimento de um imunoenensaio cromatográfico rápido de fluxo lateral para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina, utilizando antígeno recombinante otimizado de *Leishmania infantum*.** Orientadora: Juliana Lopes Rangel Fietto.

A Leishmaniose Visceral é uma doença negligenciada que acomete populações em países de clima tropical e subtropical. O Brasil encontra-se entre os seis países com maior registro de novos casos no mundo. Os cães têm importante papel no ciclo de transmissão da leishmaniose, atuando como reservatório dos parasitos, uma vez que são suscetíveis à infecção e convivem próximos aos seres humanos. Apesar de existir um medicamento para tratamento da Leishmaniose Visceral Canina (LVC), o Programa de Controle da Leishmaniose Visceral (PCLV) do Ministério da Saúde, determina como uma das estratégias para controle e erradicação da doença o controle do reservatório canino através de inquérito sorológico seguido à eutanásia de cães sororreagentes. O inquérito sorológico tem se mostrado uma estratégia falha, no que se refere a eutanásia em cães sororreagentes e ao uso do TR DPP<sup>®</sup> LVC preconizado pelo MS para o diagnóstico da LVC. Dessa forma ainda é necessário o desenvolvimento de novos imunoenensaio cromatográficos rápidos (LFIA) com melhor performance para evitar diagnóstico impreciso dos cães e melhorar o programa de controle da LVC. O antígeno alvo deste trabalho foi previamente caracterizado como bom antígeno recombinante para ensaio diagnóstico indireto de LVC por ELISA. Neste trabalho este antígeno foi otimizado *in silico*, produzido de forma recombinante. Foram realizados testes com propósito produzir, estabilizar e avaliar a funcionalidade da proteína como antígeno no diagnóstico indireto por imunocromatografia. Nos testes de adsorção, o antígeno purificado foi capaz de formar ligações estáveis ao ouro coloidal e em testes preliminares de ensaio ELISA e tiras LFIA a proteína otimizada se mostrou um antígeno funcional, pois anticorpos específicos presente em amostra de soro de cão positiva para LVC, reconheceram e reagiram com a rLicNTPDase2-Gold.

Palavras-chave: Leishmaniose visceral canina. Ensaio diagnóstico indireto. LFIA. Antígeno recombinante otimizado.

## ABSTRACT

ANDRADE, Amanda Laviola, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2023.  
**Development of a rapid lateral flow chromatographic immunoassay for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis using optimized recombinant *Leishmania infantum* antigen.**  
Adviser: Juliana Lopes Rangel Fietto.

The Visceral Leishmaniasis is a sneaky disease that affects populations in tropical and subtropical countries. Brazil is one of the top six countries with the highest number of new cases in the world. Dogs play a crucial role in the transmission cycle of leishmaniasis, acting as hosts for the parasites since they can get infected and live close to humans. Although there is a medication for Canine Visceral Leishmaniasis (CVL), the Visceral Leishmaniasis Control Program (VLCP) determines one of the strategies for controlling and eradicating the disease is to control the canine reservoir through serological surveys followed by euthanasia of seropositive dogs. However, the serological surveys have proven to be ineffective when it comes to euthanizing seropositive dogs and using the Ministry of Health, recommended TR DPP® LVC for diagnosing CVL. Therefore, there is still a need for the development of new rapid chromatographic immunoassays (LFIA) with better performance to prevent inaccurate diagnosis of dogs and improve the CVL control program. The antigen targeted in this study was previously characterized as a good recombinant antigen for indirect ELISA diagnosis of CVL. In this study, the antigen was optimized in silico and produced recombinantly. Tests were conducted to produce, stabilize, and evaluate the functionality of the protein as an antigen in indirect immunochromatography diagnosis. In adsorption tests, the purified antigen was able to form stable bonds with colloidal gold, and in preliminary ELISA and LFIA strip tests, the optimized protein proved to be a functional antigen, since specific antibodies present in a positive dog serum sample for LVC, recognized and reacted with rLicNTPDase2-Gold.

Keywords: Canine visceral leishmaniasis. Indirect diagnostic assay. LFIA. Optimized recombinant antigen.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Ciclo de vida da <i>Leishmania</i> .....	15
Figura 2- Número de Casos de Leishmaniose Visceral (LV) registrados no mundo, ano 2019.....	16
Figura 3- Configuração da tira para ensaio imunocromatográfico.....	23
Figura 4- Esquema da sequência de aminoácidos da rLicNTPDase2-Gold.....	27
Figura 5- Dados da proteína rLicNTPDase2-Gold gerados pelo programa Expasy.....	27
Figura 6- Diagrama esquemático de uma tira de LFIA - Modelo 1.....	41
Figura 7- Diagrama esquemático de uma tira de LFIA - Modelo 2.....	41
Figura 8- Verificação do melhor tempo de expressão da rLicNTPDase2-Gold (37°C).....	43
Figura 9- Verificação do melhor tempo de expressão da rLicNTPDase2-Gold (30°C) .....	44
Figura 10- Verificação do melhor tempo de expressão da rLicNTPDase2-Gold (20°C)..	44
Figura 11- Verificação do melhor tempo de expressão da rLicNTPDase2-Gold em C41 (DE3) 37°C.....	45
Figura 12- Análise da solubilidade da rLicNTPDase2-Gold expressa em BL21 (DE3) 37°C.....	46
Figura 13- Análise da solubilidade da rLicNTPDase2-Gold em diferentes concentrações de Ureia em tampão Carbonato.....	47
Figura 14- Análise da solubilidade da rLicNTPDase2-Gold em diferentes concentrações de Ureia em tampão Carbonato - Protocolo de congelamento.....	48
Figura 15- Análise da solubilidade da rLicNTPDase2-Gold, protocolo L5.....	49
Figura 16- Análise da solubilidade da rLicNTPDase2-Gold, protocolo L6.....	49
Figura 17- Análise da purificação da rLicNTPDase2-Gold do corpo de inclusão, Protocolo P1.....	50

Figura 18- Análise da purificação da rLicNTPDase2-Gold do corpo de inclusão, Protocolo P2.....	51
Figura 19- Análise da purificação da rLicNTPDase2-Gold do corpo de inclusão, Protocolo P3.....	52
Figura 20- Análise da purificação da rLicNTPDase2-Gold do corpo de inclusão, Protocolo P4. ....	53
Figura 21- Análise da purificação da rLicNTPDase2-Gold do corpo de inclusão, Protocolo P5. ....	54
Figura 22- Análise da purificação da rLicNTPDase2-Gold do corpo de inclusão, Protocolo P6. ....	56
Figura 23- Análise da purificação da rLicNTPDase2-Gold do corpo de inclusão, Protocolo P7. ....	56
Figura 24- Análise da estabilidade da rLicNTPDase2-Gold – Protocolo de P1. ....	57
Figura 25- Análise da estabilidade da rLicNTPDase2-Gold, Protocolo de P4.....	58
Figura 26- Avaliação da funcionalidade da rLicNTPDase2-Gold pelo método ELISA.....	60
Figura 27- Análise visual para determinação da concentração ideal da proteína rLicNTPDase2-Gold para otimização da sua adsorção ao ouro coloidal 40nm.....	62
Figura 28- Análise da adsorção rLicNTPDase2-Gold e Ouro coloidal 40nm, por espectro de absorção UV-visível.....	62
Figura 29- Avaliação visual das condições de adsorção mediante alteração do pH.....	64
Figura 30- Análise da adsorção por espectro de absorção UV-visível da rLicNTPDase2-Gold e Ouro coloidal 40nm em pH 7,0 e 8,0.....	65
Figura 31 Análise da adsorção por espectro de absorção UV-visível da rLicNTPDase2-Gold e Ouro coloidal 40nm em pH 7,0 e 9,0.....	65
Figura 32- Análise da adsorção por espectro de absorção UV-visível da rLicNTPDase2-Gold e Ouro coloidal 40nm em pH 7,0 e 10,0.....	66
Figura 33- Análise da adsorção por espectro de absorção UV-visível da rLicNTPDase2-Gold e Ouro coloidal 40nm em pH 7,0 e 11,0.....	66

Figura 34- Análise da adsorção por espectro de absorção UV-visível da rLicNTPDase2-Gold e Ouro coloidal 40nm em pH 7,0 ao 11,0.....	67
Figura 35- Avaliação visual das condições de adsorção da proteína BSA e ouro coloidal 40nm mediante alteração do pH.....	69
Figura 36- Análise da adsorção por espectro de absorção UV-visível da proteína BSA e Ouro coloidal 40nm em pH 8,0 ao 11,0.....	69
Figura 37- Avaliação da Imobilização de anti-dog IgG (1µg) desafiado com o tampão de diluição Tris-HCL 25mM, pH 7,5.....	71
Figura 38- Avaliação da Imobilização de anti-dog IgG (3µg) desafiado com os tampões de diluição tampões PBS tween 0,05% pH 8,0; PBS tween 0,1% pH 8,0 e PBS pH 8,0.....	72
Figura 39- Resultado do ensaio realizado com tira LFIA modelo 1.....	73
Figura 40- Resultado do ensaio realizado com tira LFIA modelo 1, utilizando diferentes tampões de diluição.....	75
Figura 41- Resultado do ensaio realizado com tira LFIA Controle Positivo, utilizando diferentes tampões de diluição.....	78
Figura 42- Resultado do ensaio realizado com tira LFIA Controle Negativo, utilizando diferentes tampões de diluição.....	78
Figura 43- Resultado do ensaio realizado com tira LFIA modelo 2, utilizando diferentes tampões de diluição.....	80

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Protocolos testados para padronização da Lise de Purificação da proteína rLicNTPDase2-Gold.....	30
Tabela 2- Protocolos testados para padronização da Purificação da proteína rLicNTPDase2-Gold.....	33
Tabela 3- Teste estabilidade de proteínas purificadas (Eluição E4) .....	58

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	12
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	15
2.1 Leishmaniose Visceral .....	15
2.2 Inquérito Canino/Tratamento e Eutanásia .....	17
2.3 Diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canino .....	19
2.4 Ecto-nucleotidasas da família E-NTPDase/rLicNTPDase- 2.....	21
2.5 Testes imunocromatográfico de fluxo lateral (LFIA) .....	22
3. OBJETIVO .....	26
3.1 Objetivo Geral .....	26
3.2 Objetivos específicos .....	26
4. METODOLOGIA .....	27
4.1 Construção da Proteína .....	27
4.2 Células competentes .....	27
4.3 Preparação de construções e transformação em cepas de <i>E. coli</i> .....	28
4.3.1 Preparação da Proteína Recombinante .....	28
4.3.2 Mini preparação plasmidial – miniprep .....	28
4.3.3 Transformação por choque térmico .....	29
4.4 Produção da rLicNTPDase2-Gold .....	29
4.4.1 Expressão Heteróloga .....	29
4.4.2 Separação da fração solúvel e dos corpos de inclusão .....	30
4.4.3 Purificação automatizada em FPLC.....	32
4.5 Dosagem de proteínas pelo método de Bradford .....	35

4.6 Dosagem de proteínas pelo método de Densitometria .....	36
4.7 Análise de proteínas por SDS-PAGE e Western Blotting.....	36
4.8 ELISA (Ensaio de imunoabsorção enzimática) .....	37
4.9 Soroteca padronizada para imunoenensaio diagnóstico de LVC. ....	38
4.10 Teste rápido imunocromatográfico .....	38
4.10.1 Avaliação da adsorção da rLicNTPDase2-Gold ao ouro coloidal 40nm.....	38
4.10.2 Teste de Funcionalização .....	39
4.10.2.1 Padronização da Membrana de Nitrocelulose (MN).....	39
4.10.2.2 Desenvolvimento do teste imunocromatográfico de fluxo lateral (LFA).	39
5. RESULTADO E DISCUSSÃO .....	42
5.1. Expressão heteróloga da proteína rLicNTPDase2-Gold .....	42
5.2 Lise de Purificação - Separação da fração solúvel e dos corpos de inclusão.....	45
5.3 Purificação automatizada em FPLC.....	49
5.4 Teste de Estabilidade da Proteína pós Purificação.....	57
5.5 Resultado ELISA .....	59
5.6 Resultado Teste Adsorção ao Ouro .....	60
5.7 Resultados Teste de Funcionalização .....	69
5.7.1 Escolha da Membrana .....	69
5.7.2 Desenvolvimento do teste imunocromatográfico de fluxo lateral (LFA).....	72
6. CONCLUSÃO.....	82
7. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA .....	84

## 1. INTRODUÇÃO

A Leishmaniose Visceral (LV) é uma doença crônica e sistêmica causada por protozoários tripanosomatídeos do gênero *Leishmania*, sendo mais comum nas Américas a espécie *Leishmania infantum chagasi*. O parasito apresenta um ciclo de vida heteroxênico, tendo como hospedeiro invertebrado o vetor flebotômico do gênero *Lutzomyia*, e vertebrado o cão (*Canis familiaris*) que atua como principal reservatório em área urbana e o homem, que se infecta ao entrar em contato com o ciclo de transmissão do parasito (BRASIL, 2019).

A LV é classificada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como uma das 20 doenças negligenciadas que acometem indivíduos em países de clima tropical e subtropical, sendo que o Brasil se encontra entre os seis países com maior registro de novos casos no ano de 2019 (OMS, 2020). No país esse agravo de caráter endêmico predominantemente de regiões rurais, tendenciando a urbanização, faz parte da lista das doenças de notificação compulsória, sendo responsabilidade da vigilância epidemiológica por meio do Programa de Controle da Leishmaniose Visceral (PCLV) o monitoramento e o desenvolvimento de estratégias para controle e erradicação da doença. As ações preconizadas tem como foco: a definição das áreas de transmissão ou de risco; aplicação de inseticidas para eliminar o vetor; diagnóstico e tratamento adequados dos casos registrados em humanos e controle do reservatório canino através do inquérito sorológico e eutanásia de cães sororreagentes (BRASIL, 2014).

Alguns estudos apontam que o controle do reservatório canino por meio da eutanásia em cães sororreagentes é uma estratégia falha, pois a realização dessa pratica traz questões éticas e emocionais para profissionais e tutores, levando-os a recusa na entrega de cães infectados para eutanásia (COSTA, 2020), Lima (2018) apresenta que 25% dos tutores de cães sororreagentes não entregam seus animais para eutanásia e Guimarães (2013) relata o percentual de 40% dessa recusa. Além disso, as pessoas não se privam do direito de terem cães como animal de estimação e guarda, mesmo residindo em áreas endêmicas de LV, optam pela reposição do animal, mantendo assim o ciclo de transmissão da doença (ANDRADE *et. al.*, 2007). Machado (2016) afirma em seus estudos a existência cultural dos tutores de substituir os animais eutanasiados, por animais jovens e mais sensíveis à infecção. Por fim, é observado um crescente número de casos notificados e a expansão da transmissão em áreas anteriormente não afetadas, o que evidencia que essa política clássica de controle não gera a redução do número de humanos e canídeos infectados com LV (CHALFUN, 2018).

Outro fator a ser analisado em relação ao controle do reservatório canino é a importância da realização do inquérito sorológico por meio de um diagnóstico preciso para a LVC, pois um resultado falso-positivo levaria à tratamento ou eutanásia desnecessários, já um falso-negativo permitiria a propagação da doença. O Ministério da saúde por meio da Nota Técnica Conjunta n° 01 /2011-CGDT-CGLAB/DEVIT/SVS/MS, estabelece que para o diagnóstico da LVC é necessário a utilização de duas técnicas distintas de ensaios sorológicos com resultado positivo, sendo padronizado o uso do teste rápido TR DPP® LVC (Biomanguinhos®) para triagem e o ensaio ELISA (EIE-LVC) (Biomanguinhos®) como teste confirmatório (BRASIL, 2011).

O TR DPP® LVC é um imunoenensaio cromatográfico rápido que apresenta em estudos baixa sensibilidade, principalmente em cães com baixo escore clínico. Também há relatos de reação cruzada do teste rápido com babesiose e detecção de *Leishmania braziliensis* e *Leishmania amazonenses*, espécies que causam leishmaniose tegumentar, o que inviabiliza a sua utilização em áreas endêmicas, devido a sobreposição de espécies (COSTA, 2019).

Outros estudos apontam a baixa sensibilidade do TR DPP® LVC e a discordância com resultados do teste confirmatório ELISA (EIE-LVC). Santos (2020) realizou análise de amostras por triagem com TR DPP® LVC, os resultados apresentados apontaram problemas relacionados a sensibilidade, observando amostras positivas com reatividade negativa para o exame confirmatório ELISA (EIE-LVC). Já Silva e colaboradores (2016) encontraram sensibilidade de 58% (95% CI: 0,43-0,72) e especificidade de 96% (95% CI: 0,93-0,98) nas amostras testadas com TR DPP® LVC.

Mediante o exposto, torna-se necessário para controle da LV o desenvolvimento de um novo imunoenensaio cromatográfico rápido assertivo para a triagem diagnóstica da LVC. O teste rápido LFIA é uma importante ferramenta diagnóstica, pois apresenta aplicação simples e eficiente, permite o atendimento de alta demanda, diminuição da sobrecarga dos laboratórios e resultados que, se eficientes, garantem a melhor conduta aos casos positivos e negativos de LVC contribuindo significativamente para o controle da doença (CAMARGO, 2015).

Estudos realizados por nosso grupo de pesquisa, de colaboradores e também de outros pesquisadores, identificaram que a infecciosidade de diferentes espécies de *Leishmania* está relacionada a ação de enzimas ecto-nucleotidases da família E-NTPDase. Essas enzimas hidrolisam nucleotídeos di e/ou trifostato (ATP e ADP) em adenosina monofostato (AMP), que pode ser hidrolisado à adenosina pelas 5'-nucleotidases, o que resulta na produção de adenosina que pode agir na modulação da resposta imunológica ao potencializar a resposta anti-

inflamatória (SILVA, 2020). Foram identificadas duas isoformas de E-NTPDase na espécie de *L. infantum chagasi*, uma maior denominada rLicNTPDase-1 (~70kDa) sendo mais expressa em promastigota de fase logarítmica e uma menor denominada rLicNTPDase2 (~40kDa) que possui maior expressão em amastigota a forma infecciosa do parasito. Como a LicNTPDase-2 é um importante fator de virulência do protozoário, pode ser aplicada em diferentes produtos biotecnológicos (FIETTO *et al.*, 2004; VASCONCELLOS *et. al.*, 2014; GOMES *et. al.*, 2015). A rLicNTPDase-2 foi expressa recombinante em sistema bacteriano, tendo bom potencial para uso em diagnóstico sorológico de LVC por ELISA (DE SOUZA *et. al.*, 2012; DE SOUZA *et. al.*, 2020). Tentativas feitas de desenvolvimento de protótipo de teste rápido imunocromatográfico com esta proteína recombinante demonstraram instabilidade da mesma na conjugação com ouro coloidal e no seu uso direto adsorvida nas tiras teste (dados não publicados).

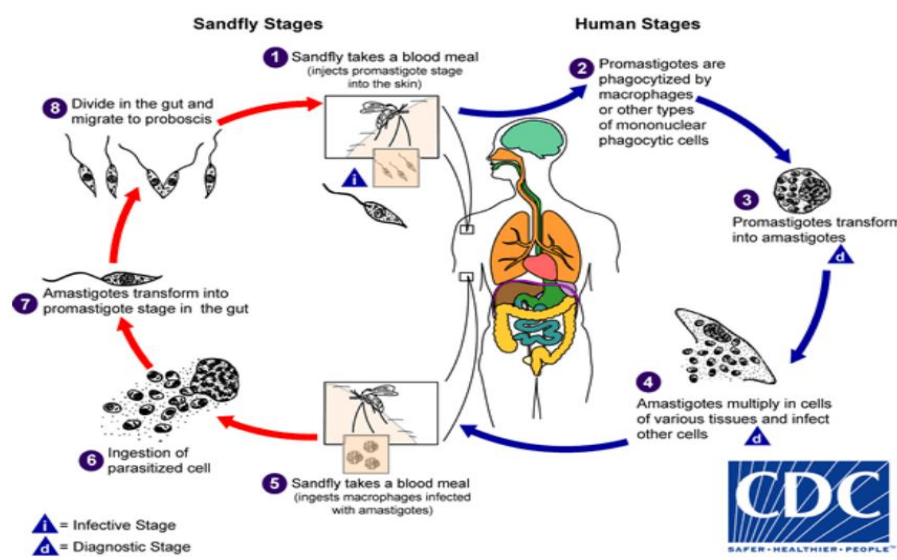
Nesse contexto, este trabalho buscou a otimização da performance do antígeno rLicNTPDase-2, denominado "rLicNTPDase2-Gold", uma nova proteína recombinante que apresenta a inclusão de um peptídeo específico para ligação ao ouro coloidal, este utilizado para revelar os testes rápidos do tipo LFIA. A proteína foi produzida em sistema bacteriano e avaliada para desenvolvimento de kit diagnóstico rápido imunocromatográfico de LVC, para detecção de anticorpos anti-NTPDase2 de *L. infantum chagasi*.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Leishmaniose Visceral

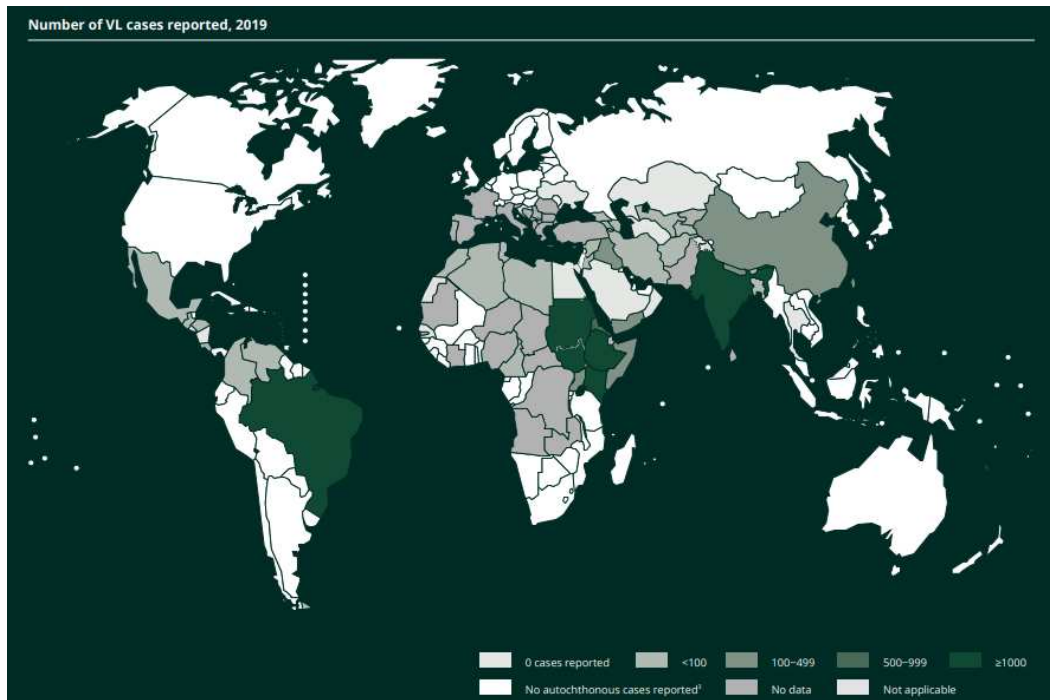
A Leishmaniose Visceral é uma doença crônica e sistêmica, conhecida popularmente como calazar, esplenomegalia tropical e febre dundun. Causada por protozoários tripanosomatídeos do gênero *Leishmania*, sendo mais comum nas Américas a espécie *Leishmania infantum*, também conhecida como *Leishmania infantum chagasi*. A doença é classificada como uma antroponose tendo como principal reservatório em área urbana o cão (*Canis familiaris*), onde o homem torna-se infectado ao entrar em contato com o ciclo de transmissão do parasito (BRASIL, 2019).

*Leishmania* apresenta um ciclo de vida heteroxênico, tendo como hospedeiro invertebrado o vetor flebotômico do gênero *Lutzomyia*, especificamente no Brasil as espécies *Lutzomyia longipalpis*, *Lutzomyia cruzi* e *Lutzomyia migonei*. No intestino desse hospedeiro o parasito se multiplica como promastigotas e no repasto sanguíneo o hospedeiro vertebrado é infectado com promastigotas que penetram nos macrófagos circulantes e multiplicam-se como amastigotas, assim ao se alimentar o flebotômico ingere macrófagos infectados com amastigotas que posteriormente tornam-se promastigotas (CDC, 2022).



**Figura 1 - Ciclo de vida da *Leishmania*.** O flebotômico fêmea contém *Leishmania* (promastigota) em sua probóscide e durante uma refeição de sangue libera no local da picada as formas promastigotas (etapa 1), que são fagocitadas por macrófagos e outros tipos de células fagocíticas (etapa 2). As formas promastigotas, em seguida, transformam-se dentro destas células em amastigotas, se multiplicam por divisão simples e infectam outras células mononucleares fagocíticas (etapas 3 e 4). O flebotômico durante o repasto sanguíneo se infecta com amastigotas que se transformam em promastigotas, se desenvolvem no intestino médio do vetor e migram para a probóscide do inseto (etapas 5,6 e7). Fonte: Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 2022.

A Leishmaniose Visceral (LV) é classificada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como uma das 20 doenças negligenciadas que acometem países de clima tropical e subtropical. No ano de 2019 foram registrados 13.814 novos casos de LV no mundo, o Brasil encontra-se entre os seis países com maior registro de novos casos entre os anos de 2017 a 2019, sendo o único do continente americano com registro  $\geq 1000$  casos (OMS, 2020).



**Figura 2 - Número de Casos de Leishmaniose Visceral (LV) registrados no mundo, ano 2019.** Os Países Brasil, Etiópia, Uganda, Quênia, Sudão e Índia apresentaram registro  $\geq 1000$  casos de LV no ano de 2019. Fonte: OMS, 2020

A Leishmaniose torna-se um preocupante problema de saúde pública devido a sua relevância clínica, ampla distribuição, limitações das medidas de controle, complexidade dos novos casos registrados a cada ano e a subnotificação que compromete o monitoramento da doença gerando agravos e trazendo altos custos ao sistema de saúde. Segundo o boletim epidemiológico do Ministério da Saúde, no ano de 2020 foram registrados 1.933 novos casos de LV concentrados nas regiões nordeste, norte e sudeste, este último com registro de 256 casos, sendo 181 no estado de Minas Gerais, com destaque nas microrregiões de saúde de Belo Horizonte, Montes Claros, Ipatinga, Sete Lagoas e Araçuaí. Nesse mesmo ano foram registrados 165 óbitos no país e uma taxa de letalidade de 9,5 % (BRASIL, 2022).

No Brasil a vigilância epidemiológica por meio do Programa de Controle da Leishmaniose Visceral (PCLV) realiza o monitoramento e o desenvolvimento de estratégias para controle e erradicação da doença. As ações preconizadas pelo programa têm como objetivo

a prevenção dos casos humanos por meio de diagnóstico e tratamento adequados, eliminação do vetor e controle do reservatório canino através do uso de coleiras contendo repelente deltametrina 4% e inquérito sorológico canino seguido da eutanásia de cães sororreagentes (BRASIL, 2014).

Os cães assumem um importante papel no ciclo de transmissão da leishmaniose, atuando como reservatório do parasito, uma vez que convivem próximos aos seres humanos e apresentam alta suscetibilidade à infecção e intenso parasitismo na pele. Outro fator é a alta taxa reprodutiva e o crescente abandono destes animais em ambientes urbanos que geram condições para que ocorra uma epidemia da enfermidade, principalmente pelo fato de cães jovens possuírem imaturidade imunológica. Além disso, os cães de guarda por permanecerem maior tempo no exterior dos domicílios tornam-se mais susceptíveis à infecção. Esses fatores auxiliam para transformação do caráter endêmico da doença que era predominantemente de regiões rurais para urbanização, assim o inquérito canino é uma estratégia que permite diagnóstico precoce com consequente interrupção na cadeia de transmissão (SILVA *et. al.* 2021).

## **2.2. Inquérito Canino/Tratamento e Eutanásia**

O Inquérito Canino consiste em avaliar a soroprevalência de leishmaniose em cães domiciliados em áreas prioritárias de um território endêmico. Os cães com resultado de exames sorológicos positivos são submetidos a eutanásia como determinado pelo Parecer N° 809/2012-AGU/CONJUR-MS/AVA que estabelece a eutanásia como política pública de controle da LV, visto não haver tratamento que promova a cura com eliminação total do agente ou medicamentos profiláticos e vacinas efetivas contra a leishmaniose (ALBUQUERQUE *et. al.*, 2018).

Alguns estudos apontam diminuição de carga parasitária com a utilização de esquemas farmacoterapêuticos utilizando medicamentos como: alopurinol, antimoniais pentavalentes, anfotericina B, domperidona, ciprofloxacina, marbofloxacina e miltefosina, entretanto a Portaria interministerial n° 1.426, de 11 de julho de 2008 proibiu o tratamento da LVC com produtos não registrados no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) e medicamento de uso humano, sobre justificativa de que não existe fármaco ou esquema terapêutico que garanta a eficácia do tratamento canino ou redução do risco de transmissão, além disso pode ocorrer indução a seleção de cepas resistentes aos medicamentos disponíveis para o tratamento em seres humanos (BRASIL, 2008).

A partir da Nota Técnica Nº 11/2016/CPV/DFIP/SDA/GM/MAPA, o MAPA autoriza a utilização do medicamento miltefosina como única alternativa terapêutica para tratamento de cães acometidos por LV, desde que o animal esteja domiciliado, e o tutor apresente condições financeiras de arcar com a totalidade do tratamento. (MAPA, 2016). Porém um grupo de pesquisadores (Brasileish), desenvolveram um esquema de estadiamento clínico, para manejo e tratamento de cães infectados sadios e/ou doentes utilizando drogas que possuem referências científicas como o alopurinol e imunomoduladores que resultam em melhora clínica e redução da carga parasitária. Junto ao uso de inseticidas tópicos com propriedade repelente, minimizando o risco de transmissão da infecção. A adoção desse protocolo é baseada na alegação do cumprimento aos princípios da Saúde única e bem estar animal, possibilitando outras alternativas a utilização da eutanásia (BRASILEISH, 2018).

O controle do reservatório canino por meio do inquérito sorológico seguido da eutanásia em cães sororreagentes, tem se mostrado uma estratégia falha. Estudos como de Guimarães (2013), este realizado por meio de entrevista com donos de cães testados para LVC na cidade de Belo Horizonte, relata que 40% dos donos de cães sororreagentes não solicitaram a eutanásia justificando o afeto pelo animal, a opção pelo tratamento e a não credibilidade da eutanásia como medida eficaz no controle da endemia.

Lima (2018) analisando o vínculo estabelecido entre humanos e animais, sendo esses considerados como membros da família, companhia e proteção, apresenta que 25% dos indivíduos avaliados não entregaram seus animais para eutanásia e 14,28% dos animais foram registrados com paradeiro desconhecido, o que favorece a disseminação da doença, pois o reservatório pode ser deslocado para regiões não endêmicas ou em caso de abandono favorecer a transferência a animais de rua.

Já Costa (2020) afirma que o controle do reservatório canino não está sendo suficiente para interromper a transmissão da LVC, pois a realização da eutanásia traz questões éticas e emocionais para profissionais e tutores, além de apresentar complexidade operacional e altos custos. Esses fatores reforçam a recusa dos donos de cães na participação nos inquéritos e na entrega de cães infectados para eutanásia, levando a baixas coberturas de inquérito canino (7 a 8%).

Outro fator importante é a reposição do animal, em um estudo feito por Andrade e colaboradores (2007), mesmo residindo em áreas endêmicas de LV, as pessoas não se privam do direito de terem cães como animal de estimação e guarda, onde 44,5% dos ex-proprietários

de cães eutanasiados por diagnóstico de LVC adquiriram outro animal, sendo que 87,5% desses adquiriram um outro cão e 19% fizeram a reposição por mais de um animal. A aquisição de um novo cão traz um impacto epidemiológico ao manter o ciclo de transmissão e de forma agravante a inserção de cães jovens que são mais susceptíveis a adquirirem doenças como a LVC.

Além disso a transmissão da LV apresenta variação zoonótica, onde o cão doméstico não é o único mamífero reservatório do parasito, sendo as cidades comumente infestadas de roedores, e em áreas próximas às matas os marsupiais, primatas e vetores promovendo um elo entre os ciclos domésticos e silvestres da doença, dificultando o combate a expansão da infecção, o que enfatiza o foco no inquérito seguido de eutanásia de cães soro reagentes uma estratégia ineficiente ao controle da LV (CHALFUN, 2018).

### **2.3. Diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina**

O diagnóstico sorológico deve apresentar relevante especificidade e sensibilidade para a LVC, pois o diagnóstico precoce possibilita interromper o ciclo de transmissão do parasito ao permitir um melhor prognóstico para o tratamento, que não seria possível com resultados falso-negativos. Em contrapartida, um resultado falso-positivo pode resultar na eutanásia do cão. Atualmente o MS por meio da Nota Técnica Conjunta nº 01 /2011-CGDT-CGLAB/DEVIT/SVS/MS padronizou o diagnóstico sorológico canino por meio dos testes TR DPP<sup>®</sup> LVC (Biomanguinhos<sup>®</sup>) como triagem e o ensaio ELISA (EIE-LVC) (Biomanguinhos<sup>®</sup>) como teste confirmatório (BRASIL, 2011).

O TR DPP<sup>®</sup> LVC é um imunoenensaio cromatográfico rápido bidirecional que detecta anticorpos específicos contra a proteína recombinante K28, esta desenvolvida pela fusão dos antígenos K9, K26 e K39 (Complexo *Leishmania donovani*) para melhor performance do teste (FUNED, 2016). Estudos apontam uma baixa sensibilidade desse teste, principalmente em cães com baixo escore clínico, também há relatos de reação cruzada do teste rápido com babesiose e detecção de espécies causadoras de leishmaniose tegumentar como *L. braziliensis* e *L. amazonensis*, o que inviabiliza a sua utilização em áreas endêmicas, devido a sobreposição de espécies (COSTA, 2019).

Ribeiro (2019), verificou em seus estudos limitações nos resultados dos testes sorológicos TR DPP<sup>®</sup> LVC executados. Houve presença de reações cruzadas com parasitas trypanosoma, com espécies causadoras de leishmaniose cutânea e outros hemoparasitas

(*Anaplasma* spp., *Ehrlichia canis*, *Babesia canis*, *Toxoplasma gondii* e *Neospora caninum*), além de resultados falso-negativos em casos de anergia ou baixos títulos.

Alguns estudos apontam a baixa sensibilidade do TR DPP<sup>®</sup> LVC, Silva et. al. (2016) encontrou sensibilidade de 58% (95% CI: 0,43-0,72) e especificidade de 96% (95% CI: 0,93-0,98) nas amostras testadas. Gomes (2020) encontrou valores de sensibilidade de 45% e especificidade 69%. Já um estudo de validação de testes diagnósticos de fase II/III utilizando 123 amostra de soros de cães predominantemente assintomáticos (69 considerados infectados) apresentou como resultado 21,74% (IC95% 13,64% a 32,82%) de sensibilidade e 92,59% (IC95% 82,45% a 97,08%) de especificidade (TEIXEIRA, 2019).

Outros fatores devem ser considerados em relação a confiabilidade do TR DPP<sup>®</sup> LVC, Santos (2020) evidenciou discordância de resultados entre o teste rápido e o teste confirmatório ELISA (EIE-LVC), observando amostras positivas com reatividade negativa para o exame confirmatório. Em outro estudo os cães infectados por *Trypanosoma caninum* reagiram ao teste TR DPP<sup>®</sup> LVC com sensibilidade de 100% e especificidade 97.5%, evidenciando a incerteza diagnóstica para LVC em áreas endêmicas com presença de animais infectados por esse parasito (ALVES, 2012). Outro fator de confusão diagnóstica são amostras de cães imunizados com Leish-Tec<sup>®</sup>, que apresentaram resultado positivos no TR DPP<sup>®</sup> LVC dificultando o processo do diagnóstico (AGONIGI, 2020) e por último podemos citar a alteração na estabilidade de amostras positivas para LVC, havendo um comportamento diferenciado das submetidas a diferentes ciclos de congelamento e descongelamento. O TR DPP<sup>®</sup> LVC apresentou baixa especificidade para amostras, devido aos baixos títulos de anticorpos encontrados a cada descongelamento (GOMES, 2016).

Portanto, são necessários mais esforços para desenvolvimento de novos antígenos recombinantes que possam melhorar a performance gerando um ensaio diagnóstico rápido mais eficiente, garantindo acessibilidade, simplicidade de execução e alta sensibilidade para detecção de casos positivos e alta especificidade para permitir um diagnóstico diferencial para demais espécies de *Leishmania* e outros tripanossomatídeos e infecções que podem conferir resultados falso positivos para LVC. Dentre os possíveis novos antígenos recombinantes temos a rLicNTPDase-2.

#### 2.4. Ecto-nucleotidases da família E-NTPDase/rLicNTPDase-2

A LV é uma doença sistêmica causada por *L. infantum*, um protozoário que infecta os macrófagos, células relacionadas à resposta imunológica no processo inflamatório. A resposta inflamatória ocorre após algum processo infeccioso ou dano tecidual que é reconhecido pelo sistema imune. Uma das formas de reconhecimento do sistema imune inato é por meio da sinalização purinérgica onde há liberação de ATP no ambiente extracelular e seu acúmulo desempenha papel quimiostático e excitatório sobre células do sistema imune. O ATP extracelular ativa receptores P2X e P2Y e células T que promovem ativação de macrófagos e células dendríticas. Após essa fase ocorre a diminuição do processo inflamatório por ação das células T regulatórias (Treg) que contém enzimas ecto-nucleotidases que hidrolisam ATP, ADP e AMP em adenosina, assim ocorre redução dos níveis de ATP extracelular e aumento nos níveis de adenosina e consequente ativação de receptores de adenosina do tipo P1 (A2A e A2B) e por fim o processo de reparo tecidual (BURNSTOCK, 2007; CARDOSO *et al.*, 2021).

No ciclo de infecção do protozoário, as ecto-nucleotidases da família E-NTPDase que são enzimas atuantes no processo de infecciosidade do parasito, hidrolisam nucleotídeos di e/ou trifostato (ATP e ADP) em adenosina monofosfato (AMP), que pode ser hidrolisada à adenosina pelas 5'-nucleotidases, resultando em modulação da resposta imunológica por potencialização da resposta anti-inflamatória induzida pela adenosina. (VASCONCELLOS *et al.*, 2014; BASTOS, 2017; SILVA, 2020).

Peres *et al.* (2018) verificou que a capacidade de hidrolise de nucleotídeos por *L. infantum* está diretamente associada ao aumento da infectividade em macrófagos, assim a enzima desempenha uma importante função na modulação da infectividade.

Foram identificadas duas isoformas de E-NTPDase na espécie de *L. infantum chagasi*, uma maior denominada rLicNTPDase-1 (~70kDa) sendo mais expressa em promastigota de fase logarítmica e uma menor denominada rLicNTPDase-2 (~40kDa) que possui maior expressão em amastigota sendo estas as principais formas infecciosas do parasito. (FIETTO *et al.*, 2004; GOMES *et al.*, 2015; VASCONCELLOS *et al.*, 2014).

A caracterização bioquímica da rLicNTPDase-2 recombinante, realizada por nosso grupo de estudo, provou que a enzima é uma nucleotidase/apirase genuína da família CD39/GDA1, pois a enzima é dependente de cátions bivalentes ( $Mg^{++}$  ou  $Ca^{++}$ ) e é inibida por conhecidos inibidores parciais da família E-NTPDase, além do fato da hidrólise ocorrer em nucleotídeos tri e difosfato, mas não monofosfato. Outro achado foi a identificação de ENTPDases em promastigotas, ancoradas em sua membrana e em locais inesperadas como

cinetoplasto, mitocôndrias e núcleo. Também foi detectado a expressão da enzima em tecidos de cães naturalmente infectados. (VASCONCELLOS *et al.*, 2014).

Como a rLicNTPDase-2 é um importante fator de virulência do protozoário, pode ser aplicada em diferentes biotecnologias, onde banco de dados de proteína apresenta apenas a isoforma rLicNTPDase-1 para o tripanossomatídeo *T. cruzi* e baixa identidade de sequência de aminoácidos entre NTPDases de mamíferos e de tripanosomatídeos que também diferem entre as diferentes isoformas 1 e 2 dos próprios tripanosomatídeos. Esses dados reforçam o potencial de aplicação da rLicNTPDase-2 recombinante no diagnóstico de leishmaniose visceral canina, pois o antígeno mais homólogo inexistente em *T. cruzi* (VASCONCELLOS *et al.*, 2014).

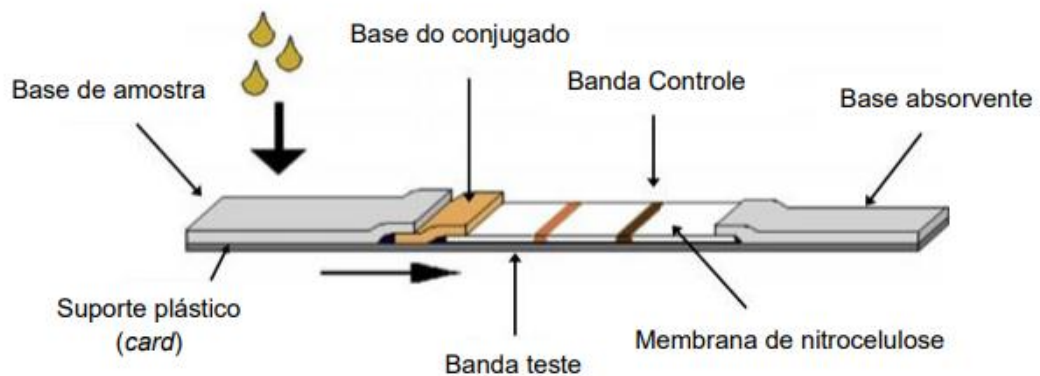
Estudos utilizando o antígeno rLic-NTPDase-2 para ensaio diagnóstico indireto por ELISA, apresentaram resultados que evidenciam o potencial da proteína no diagnóstico imunológico da LVC, possibilitando sua aplicação em outras abordagens diagnósticas como ensaios imunocromatográficos rápidos de fluxo lateral. De Souza e colaboradores (2012) em estudos de fase I, utilizaram amostras LVC- positivas, amostras negativas para leishmaniose e amostras de cães infectados com *T. cruzi*, encontrando alta sensibilidade e especificidade com valores respectivos de 100% (IC 95% = 92,60-100,0%) e 100% (IC 95% = 86,77-100,0%). Já um estudo de Fase II utilizando 651 amostras, rLicNTPDase2-ELISA apresentou alta sensibilidade (92,6%) e alta especificidade (88,5%) usando amostra padrão ouro (padronizadas por teste parasitológico e PCR) e ao ser comparado seu desempenho com os ensaios diagnósticos preconizados pelo MS para o diagnóstico da LVC, foi observado alto grau de concordância com IFI-LVC-Bio-Manguinhos (88,6%), e com IFI-LVC-Bio-Manguinhos acoplado a EIE LVC-Bio-Manguinhos (82,9%) (de SOUZA *et al.*, 2020).

## **2.5 Testes imunocromatográficos de fluxo lateral (LFIA)**

O teste rápido LFIA formato indireto utilizado para detecção de anticorpos ou antígenos, é uma importante ferramenta diagnóstica, apresenta uma aplicação simples e quando otimizado pode ser também eficiente (alta sensibilidade e especificidade). Seu uso é muito útil pois tem atendimento de alta demanda podendo ser realizado em campo/“point of care”, diminui a sobrecarga dos laboratórios e permite resultados que garantem a melhor conduta aos casos positivos e negativos, contribuindo significativamente para o tratamento e controle de uma doença (CAMARGO, 2015).

Esse teste diagnóstico é fundamentado no método imunocromatográfico, onde os componentes de uma amostra migram por capilaridade através do sistema de membranas,

sofrendo influência de diferentes forças intermoleculares. Os antígenos ou anticorpos são imobilizados em uma fase sólida delimitando uma área teste e para assegurar a qualidade do ensaio, o componente reativo tanto para testes positivos quanto para negativos, é imobilizado em uma área denominada controle, as demais membranas são sobrepostas, sendo a membrana do conjugado impregnado com reagentes secos que consiste em um componente biossensor revelador da interação antígeno-anticorpo. Se o anticorpo ou antígeno (que varia com o objetivo de detecção do teste) estiver presente na amostra, este ligará ao conjugado que apresenta uma molécula insolúvel (ouro coloidal) formando um imunocomplexo que migrará sobre a membrana de nitrocelulose interagindo com o imobilizado na área teste. O resultado positivo é revelado pelo depósito do corante coloidal na linha de captura. A amostra flui por todo o sistema revelando a linha controle que indica a funcionalidade do teste e os componentes que não tenham reagido com nenhuma região da membrana se depositam na membrana absorvente (O'FARRELL, 2013; JAPOLLA et. al., 2015). O formato clássico para a montagem de um sistema imunocromatográfico é apresentado na Figura 3.



**Figura 3 – Configuração das tiras para ensaio imunocromatográfico.** A amostra é adicionada à membrana de amostra, e migra para a membrana do conjugado, onde as partículas do conjugado foram imobilizadas. A amostra interage com o conjugado e ambos migram para a membrana de reação. Nesta membrana estão imobilizados componentes biológicos específicos do ensaio, que formam a linha teste e a linha controle, onde serão capturados o analito e o conjugado. O excesso de reagente move-se além das linhas de captura, sendo aprisionados na membrana absorvente. Os resultados são interpretados na membrana de reação, pela presença ou ausência de linhas de conjugado capturado. Fonte: Adaptado de O'FARRELL, 2013.

O sistema imunocromatográfico é composto por diferentes matrizes e um grande número de componentes críticos (impregnação do conjugado, imobilização do componente reativo, solução diluente, taxa de fluxo e hidrofobicidade da membrana) combinados que podem interagir entre si e interferir no desempenho da tira e o correto funcionamento do teste (JAPOLLA et. al., 2015).

A matriz de reação geralmente é constituída por uma membrana de nitrocelulose (MN), um polímero sintetizado pela reação da celulose com ácido nítrico, onde os grupos hidroxila da celulose são substituídos por grupos nitrato, esse material apresenta alta capacidade de ligação a proteínas possibilitando a imobilização dos antígenos e alto fluxo de capilaridade que varia com a porosidade da membrana. Assim membranas com menor porosidade apresentam o tempo de fluxo capilar maior e conseqüentemente a taxa de fluxo será menor e a sensibilidade será maior. Como desafio à sua utilização apresenta alta hidrofobicidade que precisa ser contornada (utilização de tampão de bloqueio) para realização eficiente do ensaio (MILLIPORE, 2015).

A imobilização dos antígenos à membrana de nitrocelulose depende inicialmente das características específicas da proteína. Comumente esse processo ocorre por adsorção direta, podendo haver interações hidrofóbicas entre a membrana e regiões hidrofóbicas da proteína e/ou interações eletrostáticas entre os dipolos dos grupos nitrato da nitrocelulose e aqueles intrínsecos à molécula proteica. A mudança de um material ou reagente tipicamente afeta o desempenho da adsorção tornando o processo reversível. O aumento do fluxo, por exemplo, diminui a concentração efetiva de antígeno que se liga ao anticorpo de captura (presente na amostra), já que os componentes do par reativo permanecem pouco tempo próximos. Outro parâmetro crítico para o desempenho da membrana é o uso de surfactantes e detergentes, esses podem diminuir a adsorção das proteínas ligando-se preferencialmente na membrana ou formando um complexo com a molécula da proteína antes dela adsorver, além disso o aumento desses reagentes provoca alargamento da banda e seu espalhamento gera perda do sinal e um potencial diminuição na sensibilidade do ensaio (CAMARGO, 2015; MILLIPORE, 2015).

A matriz do conjugado pode ser constituída por fibra de celulose, poliéster ou polipropileno tratados para torná-los hidrofílicos ou ainda fibra de vidro. Esse material deve permitir a impregnação do conjugado, sua secagem e uniformidade na corrida da amostra que deve passar pela base do conjugado e o reagente de detecção se desprende da fibra, se solubiliza e se move junto com a amostra em direção à membrana de nitrocelulose (CAMARGO,2015).

O conjugado é formado pela ligação entre a proteína e ouro coloidal, onde a estabilidade da conjugação depende de características como o ponto isoelétrico da proteína (pI), o pH da reação, a concentração de proteína, a concentração de sais e o tamanho da partícula do ouro coloidal, há aumento de sensibilidade no teste em partículas maiores, porém partículas com mais de 40 nm diminuem a estabilidade do ouro (JAPOLLA et. al, 2015). Algumas interações proporcionam a estabilidade dos complexos proteína-ouro como adsorção envolvendo bolsas

hidrofóbicas na ligação da proteína à superfície do metal; a atração eletrônica entre as partículas de ouro carregadas negativamente e os abundantes locais carregados positivamente na molécula de proteína e o potencial do ouro para ligação covalente aos grupos sulfidríla livres, dessa forma a adição de sais como NaCl, ao conjugado ou ao tampão diluente causaria a coagulação das partículas de ouro devido a interações eletrostáticas, hidrofóbicas e de Van der Waals (HERMANSON, 2007).

Dados não publicados do nosso grupo de pesquisa demonstraram que apesar de todo potencial de aplicação no imunodiagnóstico, a rLicNTPDase-2 tem limitação para uso em teste rápido imunocromatográfico, pois embora possa ser imobilizada em membrana de nitrocelulose conforme demonstrado por nosso grupo de pesquisa (CASTRO, *et. al.* 2022), anticorpos anti-IgG de cão não foram estáveis quando conjugados ao ouro coloidal (dados não publicados) resultando em falha na revelação dos testes preliminares em tiras convencionais (formato da figura 3). Um segundo formato possível de LFIA usando a rLicNTPDase-2 foi testado previamente (dados não publicados) através da sua conjugação ao ouro coloidal, que é a molécula reveladora do resultado, porém não foi obtido resultados satisfatórios na formação do conjugado, impossibilitando a revelação do teste rápido. Portanto, neste presente trabalho, foi realizado o desenho de um gene sintético modificado otimizando esta proteína para se ligar ao ouro e permitir formação do complexo com ouro coloidal, este antígeno foi denominado rLicNTPDase2-Gold. O antígeno otimizado foi produzido e avaliada sua aplicação em protótipos para o desenvolvimento de kit diagnóstico rápido imunocromatográfico de LVC.

### 3. OBJETIVO

#### 3.1 Objetivo Geral

Desenvolver um protótipo de um kit de diagnóstico rápido de fluxo lateral IA (LFIA) para Leishmaniose visceral canina, produzido por meio de um antígeno recombinante rLicNTPDase2-Gold de *Leishmania infantum*.

#### 3.2 Objetivos específicos

- Expressar em *Escherichia coli* a proteína rLicNTPDase2-Gold;
- Otimizar a expressão heteróloga da proteína rLicNTPDase2-Gold, por meio de modificações nos parâmetros de expressão
- Padronizar a purificação da proteína rLicNTPDase2-Gold por meio de cromatografia de afinidade por método automatizado utilizando FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography).
- Conjugar a rLicNTPDase2-Gold à ouro coloidal de 40 nm e avaliar sua eficiência e estabilidade na formação do conjugado;
- Desenvolvimento um protótipo de LFIA utilizando a proteína rLicNTPDase2-Gold para LVC.

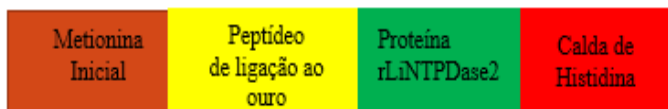
## 4. METODOLOGIA

### 4.1 Construção da Proteína

A construção do antígeno de interesse, ocorreu a partir de modificações da proteína rLicNTPDase-2 descrita por De Souza (2013). Para otimizar a ligação desta proteína ao Ouro Coloidal, permitindo seu uso em teste rápido imunocromatográfico, um peptídeo descrito por Lévy, R. e colaboradores (2004) foi incluído à construção da rLicNTPDase-2, como descrito no esquema (Figura 4) do desenho da proteína denominada rLicNTPDase2-Gold.

A sequência de aminoácidos foi convertida em nucleotídeos com otimização de códons para expressão em sistema bacteriano. O gene sintético otimizado foi produzido e subclonado em pET11a usando-se os sítios de restrição *NdeI/BamHI*, sendo esta parte feita por serviço de empresa especializada (FastBio). A sequência de aminoácidos não será apresentada neste trabalho, uma vez que está sob sigilo.

As características da proteína foram obtidas a partir da anotação da sequência de aminoácidos, através do programa Expasy (Figura 5)



**Figura 4:** Esquema da sequência de aminoácidos da rLicNTPDase2-Gold. Metionina inicial, região de ligação ao ouro coloidal, cauda de histidina. Fonte: Dados da pesquisa.

Number of amino acids: 397
Molecular weight: 44076.04
Theoretical pI: 7.63

**Figura 5:** Dados da proteína rLicNTPDase2-Gold gerados pelo programa Expasy: Sequência de aminoácidos: 397 AA, Massa molecular: 44.076 kDa, Ponto Isoelétrico: 7,63  
Fonte: Gerada pelo programa expasy a partir dos dados da pesquisa.

### 4.2 Células competentes

Foram produzidas células competentes de *E. coli* linhagem DH5 $\alpha$ , BL21 (DE3) RIL e C41 (DE3). Para cada célula foi realizado um pré-inóculo no volume de 10 mL de meio Luria Bertani (LB), adicionado do antibiótico cloranfenicol (100 $\mu$ g/mL) para BL21 (DE3) RIL e como controle para cada célula, um volume de meio LB igual ao pré-inóculo e ampicilina (100 $\mu$ g/mL). As culturas ficaram incubadas em crescimento overnight a 37°C, 180 RPM. Posteriormente para obtenção do inóculo, foi adicionado 2 mL de pré-inóculo para cada 100 mL de meio LB, mantendo em crescimento na temperatura de 37°C, 180 RPM até atingir D.O

próxima a 0,5-0,8. Em seguida, a cultura foi transferida para 2 tubos falcon de 50 mL e deixada no gelo por 10 minutos, em ambiente estéril. Decorrido o tempo, houve centrifugação das culturas por 10 minutos a 4000 RPM, 4°C. Para etapa de lavagem o sobrenadante foi descartado e cada pellet suspenso em 10 mL do tampão cálcio (CaCl<sub>2</sub> 0,1M), gelado, sendo centrifugado por 10 minutos a 4000 RPM, 4°C. Essa etapa foi realizada mais uma vez, porém na segunda lavagem após o pellet ser suspenso as células ficaram por 30 minutos no gelo, para posterior centrifugação. Por último o sobrenadante foi descartado e o pellet suspenso cuidadosamente em 2 mL de tampão cálcio glicerol (CaCl<sub>2</sub> 0,1M;15% glicerol), gelado. As células foram separadas em alíquotas de 200 µL por microtubo e estocadas imediatamente em freezer na temperatura -80°C.

### **4.3 Preparação de construções e transformação em cepas de *E. coli***

#### **4.3.1 Preparação da Proteína Recombinante**

A construção da rLiNTPDase2-GOLD foi recebida liofilizada, a mesma foi homogeneizada em água ultrapura Mili-Q estéril, mediante as recomendações do fabricante, obtendo a concentração de 100ng/µL. Posteriormente, foi feita a amplificação do gene por subclonagem do gene sintético em *E. coli* DH5α, seguindo o protocolo de transformação por choque térmico.

#### **4.3.2 Mini preparação plasmidial – miniprep**

Foi realizado uma miniprep para purificação e extração do DNA amplificado por subclonagem, que será utilizado para a transformação das cepas de expressão. Inicialmente foi realizado um pré-inóculo da DH5α contendo o DNA de interesse, utilizando meio LB aquecido por 37°C, a 180 RPM overnight. No dia seguinte, 1,5 mL de cultura bacteriana foi centrifugado por 30 segundos na velocidade máxima e descartado o sobrenadante, repetiu-se esse processo. Depois foi adicionado 600 µL de água ao pellet celular sendo suspenso completamente e 100 µL de tampão de lise celular (azul) misturado e invertido por 6 vezes. Logo após, adicionou-se 350 µL de solução de neutralização, homogeneizando e invertendo, seguido de centrifugação em velocidade máxima por 3 minutos. O sobrenadante (~ 900µl) foi transferido para uma Mini coluna PureYield™ sem perturbar o sedimento de restos celulares, e centrifugada em velocidade máxima por 15 segundos, sendo o sobrenadante descartado. Em continuidade, foi adicionado 200 µL de tampão lavagem para remoção de endotoxinas (ERB) à mini coluna e novamente centrifugado em velocidade máxima por 15 segundos. Então, 400 µL de solução de

lavagem de coluna (CWC) foi adicionada à mini coluna, centrifugando-se, dessa vez, por 30 segundos. Logo em seguida, foi transferida a mini coluna para um eppendorf de 1,5 mL limpo e, em seguida, adicionado 30  $\mu$ L de água sem nuclease diretamente para a matriz da mini coluna, que ficou em repouso por 1 minuto em temperatura ambiente. Por fim, centrifugado por 15 segundos para eluir o DNA plasmidial, que foi armazenado a  $-20^{\circ}$  C. Para confirmar a extração do DNA dosou-se no nanodrop (SAMBROOK et al., 1989).

### **4.3.3 Transformação por choque térmico**

A transformação foi realizada em cepa de expressão *E. coli* BL21 (DE3) RIL, C41 (DE3) e cepa de amplificação do gene DH5 $\alpha$ . Inicialmente foi adicionado o DNA às células competentes, de modo que a quantidade ficasse em torno de 100 ng. Os microtubos foram homogeneizados, identificados e ficaram no gelo por 30 min. Também foi feito um controle negativo das células competentes, no qual não foi adicionado o DNA. Passado o tempo, realizou-se um choque térmico colocando a células à  $42^{\circ}$ C por 45 segundos (para DH5 $\alpha$ ) ou por 90 segundos (para BL21 e C41). Em seguida, os microtubos retornaram para o gelo por, aproximadamente, 2 minutos. Após foi adicionado 800  $\mu$ L de meio LB e as células incubadas a  $37^{\circ}$ C, 180 RPM por 1 hora. Por fim, os microtubos foram centrifugados a 8.000 RPM, por 10 minutos para sedimentar as células, descartando o sobrenadante, deixando cerca de 100  $\mu$ L de meio para suspender o pellet. As células foram plaqueadas em meio LB sólido, junto a antibiótico (100 $\mu$ g/mL de ampicilina) e crescidas a  $37^{\circ}$ C de 12-16 horas em estufa BOD (SAMBROOK et al., 1989).

## **4.4 Produção da rLicNTPDase2-Gold**

### **4.4.1 Expressão Heteróloga**

A expressão da rLicNTPDase2-Gold foi testada em diferentes condições de tempo e temperatura, baseando-se em procedimento descrito por De Souza, R. (2013). O sistema escolhido foi o bacteriano, usando a construção pET11a-rLicNTPDase2-Gold em *E. coli* BL21 (DE3) RIL e C41 (DE3). Para cada expressão foi preparado a partir dos transformantes obtidos na placa, um pré-inóculo no volume de 3% do inóculo, onde as células transformantes foram crescidas em meio Luria Bertani (LB) com 100  $\mu$ g/mL de ampicilina por 16 horas a 180 RPM e  $37^{\circ}$  C. Após essa etapa o pré-inóculo foi transferido para o volume de meio LB correspondente a indução programada, o qual foi incubado nas mesmas condições até o estabelecimento da fase log ( $D.O_{600\text{ nm}} = 0,6$ ). Em seguida, a expressão proteica foi induzida pela adição de isopropil- $\beta$ -

d tiogalactopiranosídeo (IPTG) em concentração 0,2 mM. Para expressão em *E. coli* BL21 (DE3) RIL foram testadas as condições de temperatura 37°C, 30°C e 20°C nos Tempos 0h, 2h, 4h, 6h e overnight, todas mantida por agitação a 180 RPM. A expressão em C41 (DE3) foi avaliada na temperatura de 37°C nos Tempos 0h, 2h, 4h, 6h e overnight e agitação a 180 RPM. Após decorrido o tempo de expressão, o inóculo foi centrifugado a 5000 RPM por 15 minutos a 4 °C. O pellet resultante de grandes volumes de indução foi suspenso em 40 mL de sobrenadante e novamente centrifugado a 5000 RPM por 15 minutos a 4 °C. Por fim, o pellet da segunda centrifugação foi armazenado a -80°C.

#### 4.4.2 Separação da fração solúvel e dos corpos de inclusão

Para padronização da Lise de Purificação, alguns protocolos foram testados segundo o procedimento descrito por De Souza, R. (2013) e Qi e colaboradores (2015) com adaptações. Os protocolos foram denominados L1, L2, L3, L4, L5 e L6, como representados na tabela 1.

Protocolo de Lise	Pellet de expressão	Tampão de lise	Etapas de lavagem	Tampão de solubilização
L1	BL21 (DE3) RIL	Tampão carbonato 0,05M pH 9,6	Não	Tampão carbonato 0,05M + Uréia 8M, pH 9,6
L2	C41 (DE3)	Tampão carbonato 0,05M pH 9,2	Não	Tampão carbonato 0,05M + Uréia (1M, 2M, 4M, 6M e 8M), pH 9,6
L3 Congelamento	C41 (DE3)	Tampão carbonato 0,05M pH 9,2	Não	Tampão carbonato 0,05M + Uréia (0,5M, 1M, 2M, 3M e 4M) pH 9,2
L4 Congelamento	C41 (DE3)	Tampão carbonato 0,05M pH 9,2	Não	Tampão carbonato 0,05M + Uréia 1M, pH 9,2
L5 Congelamento	C41 (DE3)	Tampão carbonato 0,05M pH 9,2	2 etapas: Tampão carbonato 0,05M pH 9,2	Tampão carbonato 0,05M + Uréia 1M, pH 9,2
L6 Congelamento	C41 (DE3)	Tampão carbonato 0,05M pH 9,2	2 etapas: Tampão carbonato 0,05M pH 9,2. 2ª lavagem congelado -20°.	Tampão carbonato 0,05M + Uréia 1M, pH 9,2

**Tabela 1: Protocolos testados para padronização da Lise de Purificação da proteína rLicNTPDase2-Gold.** Segundo De Souza, R. (2013) e Qi e colaboradores (2015) com adaptações.

O Protocolo L1 foi realizado utilizando pellet de indução da cepa de expressão BL21(DE3) RIL. O pellet de 25 mL foi mantido em gelo e suspenso em tampão carbonato

0,05M pH 9,6 (tampão de lise), adicionado de inibidores de prótese Pepstatina A 1 µg/mL, Leupeptina 1 µg/mL, Aprotinina 1 µg/mL e da enzima Lisozima 1 mg/mL. As amostras foram mantidas em gelo por 30 minutos e sonicadas com amplitude 20W por 2 minutos, 10s on/10s off, a 4°C. Logo após, foram centrifugadas a 4°C e 30 min 8500 RPM. A fração solúvel (sobrenadante) foi armazenado a 4°C pra análises posteriores. O pellet referente aos corpos de inclusão foi solubilizado em Tampão carbonato 0,05M + Uréia 8M, pH 9,6, incubado por 20 minutos a 60 °C e centrifugado a 15000 RPM por 25 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi armazenado a -20 °C. O volume do tampão de lise e tampão de solubilização foram adicionados mediante o volume do pellet de indução, onde foram adicionados 1mL de cada tampão para pellet de 5 mL de indução e 15mL para 400mL de indução. A alta concentração de uréia foi utilizada tendo em vista que se trata de uma proteína insolúvel (De SOUZA, 2013).

O Protocolo L2 foi utilizado para lise de pellet da cepa de expressão C41 (DE3). O pellet de indução de 150 mL foi mantido em gelo e suspenso em 10 mL de Tampão carbonato 0,05M pH 9,2 (tampão de lise), adicionado de inibidores de prótese Pepstatina A 1 µg/mL, Leupeptina 1 µg/mL, Aprotinina 1 µg/mL e da enzima Lisozima 1 mg/mL. As amostras foram mantidas em gelo por 30 minutos e sonicadas com amplitude 20W por 2 minutos, 10s on/10s off, a 4°C. O extrato bruto obtido foi separado em frações de 2 mL em 5 falcons. Logo após, foram centrifugadas a 4°C e 30 min 8500 RPM. A fração solúvel (sobrenadante) foi armazenado a 4°C pra análises posteriores. O pellet referente aos corpos de inclusão foi solubilizado em 2mL e diferentes concentrações de Tampão carbonato 0,05M pH 9,2 adicionado de ureia. Para verificar melhor condição de solubilização foram testadas as concentrações de ureia: 1M, 2M, 4M, 6M e 8M. o pellet suspenso foi incubado por 20 minutos a 60 °C e centrifugado a 15000 RPM por 25 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi armazenado a -20 °C.

Para Lise de Purificação protocolo L3 o pellet de indução de 300 mL da cepa de expressão C41 (DE3) foi mantido em gelo e suspenso em 6mL de Tampão carbonato 0,05M pH 9,2 (tampão de lise), adicionado de inibidores de prótese Pepstatina A 1 µg/mL, Leupeptina 1 µg/mL, Aprotinina 1 µg/mL e da enzima Lisozima 1 mg/mL. As amostras foram mantidas em gelo por 30 minutos e sonicadas com amplitude 20W por 2 minutos, 10s on/10s off, a 4°C. O extrato bruto obtido foi separado em frações de 1 mL em 6 eppendorffs. Logo após, foram centrifugadas a 4°C e 30 min 8500 RPM. A fração solúvel (sobrenadante) foi armazenado a 4°C pra análises posteriores. O pellet referente aos corpos de inclusão foi solubilizado em 1mL e diferentes concentrações de Tampão carbonato 0,05M pH 9,2 adicionado de ureia. Para verificar melhor condição de solubilização foram testadas as concentrações de ureia: 0,5M, 1M,

2M, 3M e 4M. O pellet suspenso foi congelado (-20°C) Overnight e no dia seguinte, o solubilizado foi descongelado e centrifugado a 4°C e 13000 RPM por 20 min e o sobrenadante (corpos de inclusão) coletado e armazenado a -20°C (QI *et. al.*, 2015).

Para execução do protocolo L4, seguiu-se etapas semelhantes ao L3, diferindo-se no volume do pellet de indução de 400 mL da cepa de expressão C41 (DE3), nos volumes de 10 mL para Tampão de lise e de solubilização, sendo esse padronizado como Tampão carbonato 0,05M + Ureia 1M pH 9,2. O descongelamento do solubilizado foi realizado no dia da purificação, sendo esse centrifugado a 4°C e 13000 RPM por 20 min e o sobrenadante (corpos de inclusão) coletado e filtrado em filtro de 0,42 µm (QI *et. al.*, 2015).

Os Protocolos L5 e L6 apresentam execuções semelhantes ao protocolo L4, com alterações na etapa de sonicação com amplitude 40 watts, 2 min 10 on 10 off e inclusão da etapa de lavagem, esta realizada anteriormente a suspensão do pellet referente corpos de inclusão. Em L5 a etapa de lavagem ocorreu após coletar a fração Solúvel, o pellet foi suspenso em 10mL de Tampão carbonato 0,05M pH 9,2 e centrifugado 8500 RPM 30 min, o sobrenadante foi armazenado a 4°C pra análises posteriores, houve repetição da etapa de lavagem e posteriormente as etapas referentes ao pellet dos corpos de inclusão como descrito em L4. Em L6 a etapa de lavagem também ocorreu após coletar a fração solúvel, o pellet foi suspenso em 10mL de tampão carbonato 0,05M pH 9,2 e centrifugado 12000 RPM 10 min, o sobrenadante foi armazenado a 4°C, o pellet foi suspenso mais uma vez 10mL de tampão carbonato 0,05M pH 9,2 e solubilizado congelado -20° C, no dia seguinte a amostra foi descongelada e centrifugar a 13000 RPM por 20min, sendo coletado o sobrenadante e armazenado a 4°C pra análises posteriores. Ao finalizar as etapas de lavagens realizou-se as etapas referente ao pellet dos corpos de inclusão como descrito em L4.

#### **4.4.3 Purificação automatizada em FPLC**

A partir dos corpos de inclusão solubilizados na lise de purificação, procedeu-se à purificação automatizada em FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography). A amostra foi injetada no Akta purifier FPLC (GE Healthcare Life Sciences, Piscataway, NJ) utilizando a coluna HisTrap FF crude de 1 mL. A estratégia utilizada foi a cromatografia de afinidade baseada na interação entre beads de agarose ligados ao níquel (coluna HisTrap) com a cauda de histidina presente na proteína recombinante. Para otimização da purificação dos corpos de inclusão e padronização do procedimento, diferentes programas foram utilizados no FPLC, denominados como P1, P2, P3, P4, P5, P6 e P7 (representados na tabela 2).

<b>Protocolo</b>	<b>Pellet</b>	<b>Lise de Purificação</b>	<b>Tampão A</b>	<b>Tampão B</b>
<b>P1</b>	BL21(DE3) RIL	L1 s/ Congelamento (8M)	Tampão carbonato 0,05M, Uréia 8M e Imidazol 10 mM, pH 9,6	Tampão carbonato 0,05M, Uréia 8M e Imidazol 300 mM, pH 9,6 (100% de B)
<b>P2</b>	C41(DE3)	L2 s/ Congelamento (8M)	Tampão carbonato 0,05M, Uréia 8M e Imidazol 10 mM, pH 9,6	Tampão carbonato 0,05M, Uréia 8M e Imidazol 300 mM, pH 9,6 (100% de B)
<b>P3</b>	C41(DE3)	L4 Congelamento (1M)	Tampão carbonato 0,05M, Uréia 1M e Imidazol 5 mM, pH 9,2	Tampão carbonato 0,05M, Uréia 1 M e Imidazol 250 mM, pH 9,2 (100% de B)
<b>P4</b>	C41(DE3)	L4 Congelamento (1M)	Tampão carbonato 0,05M, Uréia 1M e Imidazol 10 mM, pH 9,2	Tampão carbonato 0,05M, Uréia 1 M e Imidazol 250 mM, pH 9,2 (steps 50% e 100% de B)
<b>P5</b>	C41(DE3)	L4 Congelamento (1M)	Tampão carbonato 0,05M, Uréia 1M e Imidazol 10 mM, pH 9,2	Tampão carbonato 0,05M, Uréia 1 M e Imidazol 250 mM, pH 9,2 (steps de 10%, 20%, 30%, 40%, 50% e 100% de B)
<b>P6</b>	C41(DE3)	L5 Congelamento (1M) + Etapas de lavagem	Tampão carbonato 0,05M, Uréia 1M e Imidazol 10 mM, pH 9,2	Tampão carbonato 0,05M, Uréia 1 M e Imidazol 250 mM, pH 9,2 (100% de B)

**Tabela 2: Protocolos testados para padronização da Purificação da proteína rLicNTPDase2-Gold.** Segundo De Souza, R. (2013) com adaptações. Fonte: Dados da pesquisa

Em P1, foi realizado a purificação dos copos de inclusão obtidos pela cepa de expressão BL21 (DE3) RIL segundo o protocolo de lise L1 descrito no item 4.2.2, inicialmente a coluna de 1 mL foi inserida e equilibrada com tampão A (Tampão carbonato 0,05M, Uréia 8M e Imidazol 10 mM, pH 9,6). Após o equilíbrio da coluna, a amostra foi injetada a uma taxa de 1 mL/min, e a coluna foi lavada com tampão A por aproximadamente, 25 volumes de coluna (CV), em seguida foi feita a lavagem para retirada das proteínas não ligadas (VNL) até a absorbância a 280 nm da amostra eluída atingir 10 mAu. Na sequência, foram realizados eluições com 100% do tampão B (Tampão carbonato 0,05M, Uréia 8M e Imidazol 300 mM,

pH 9,6). Em P2, P3, P4 e P5, os copos de inclusão purificados foram obtidos pela cepa de expressão C41 (DE3).

Em P2, a amostra purificada foi obtida por meio do protocolo de lise L2 descrito no item 4.2.2. utilizando um pellet de indução de 400mL e um volume de 15 mL de Tampão de lise (Tampão carbonato 0,05M pH 9,2) e Tampão de solubilização (Tampão carbonato 0,05M + Ureia 8M, pH 9,2). Após inserir e equilibrar a coluna de 1mL com o tampão A (Tampão carbonato 0,05M, Uréia 8M e Imidazol 10 mM, pH 9,6) a amostra foi injetada a uma taxa de 1 mL/min, e a coluna foi lavada com tampão A por aproximadamente, 25 volumes de coluna (CV), em seguida foi feita a lavagem para retirada das proteínas não ligadas (VNL) até a absorbância a 280 nm da amostra eluída atingir 10 mAu. Na sequência, foram realizados eluições com 100% do tampão B (Tampão carbonato 0,05M, Uréia 8 M e Imidazol 300 mM, pH 9,6).

Em P3, a lise de purificação foi otimizada por meio do protocolo L4 descrito no item 4.2.2, houve modificação da concentração de Imidazol dos tampões A e B. A coluna de 1 mL foi inserida ao FPLC e equilibrada com o tampão A (Tampão carbonato 0,05M, Uréia 1M e Imidazol 5 mM, pH 9,2) a amostra foi injetada a uma taxa de 1 mL/min, e a coluna foi lavada com tampão A por aproximadamente, 25 volumes de coluna (CV), em seguida foi feita a lavagem para retirada das proteínas não ligadas (VNL) até a absorbância a 280 nm da amostra eluída atingir 10 mAu. Na sequência, foram realizados eluições com 100% do tampão B (Tampão carbonato 0,05M, Uréia 1 M e Imidazol 250 mM, pH 9,2).

Em P4 e P5, O solubilizado dos corpos de inclusão também foi obtido pelo protocolo de lise L4. Em ambas purificações, após a inserção da coluna de 1mL e equilíbrio da mesma com o tampão A (Tampão carbonato 0,05M, Uréia 1M e Imidazol 10 mM, pH 9,2) a amostra foi injetada a uma taxa de 0,5 mL/min, e a coluna foi lavada com tampão A por aproximadamente, 25 volumes de coluna (CV), em seguida foi feita a lavagem para retirada das proteínas não ligadas (VNL) até a absorbância a 280 nm da amostra eluída atingir 10 mAu. Na etapa de eluição em P4 foi realizado steps de 50% e 100% do tampão B (Tampão carbonato 0,05M, Uréia 1 M e Imidazol 250 mM, pH 9,2). Já em P5 foram realizados steps de 10%, 20%, 30%, 40%, 50% e 100% do tampão B.

Em P6 o solubilizado dos corpos de inclusão foi obtido pelo protocolo de lise L5 descrito no item 4.2.2, já em P7 o solubilizado foi adquirido por meio da lise L6 também descrito no item 4.2.2. Em ambas purificações, após a inserção da coluna de 1mL e equilíbrio da mesma

com o tampão A (Tampão carbonato 0,05M, Uréia 1M e Imidazol 10 mM, pH 9,2) a amostra foi injetada a uma taxa de 0,5 mL/min, e a coluna foi lavada com tampão A por aproximadamente, 25 volumes de coluna (CV), em seguida foi feita a lavagem para retirada das proteínas não ligadas (VNL) até a absorbância a 280 nm da amostra eluída atingir 10 mAu. A eluição foi realizada em 100% do tampão B (Tampão carbonato 0,05M, Uréia 1 M e Imidazol 250 mM, pH 9,2).

#### **4.5 Dosagem de proteínas pelo método de Bradford**

A concentração de proteínas foi avaliada pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976). O ensaio de Bradford foi realizado em microplaca de 96 poços, consistindo num volume final de 200  $\mu$ L para cada poço da placa. Primeiramente, foi preparada uma solução estoque de BSA (albumina do soro bovino) 14 mg/mL e esta foi diluída 10 vezes. Foram utilizados 8 poços subsequentes da placa, ao primeiro poço foi adicionada 200  $\mu$ L da diluição de BSA, aos demais poços 100  $\mu$ L de água destilada, O BSA do primeiro poço foi passando no volume de 100  $\mu$ L para o segundo poço contendo 100  $\mu$ L de água destilada e assim sucessivamente, em 7 diluições seriadas, até no penúltimo poço. Ao último poço não foi adicionado BSA, ficando apenas com 100  $\mu$ L de água destilada. Um volume de 10  $\mu$ L de cada diluição foi transferido para novos poços da placa, seguindo a ordem de diluição, e, posteriormente, foi adicionado 10  $\mu$ L tampão. Para quantificar os corpos inclusão foi utilizado o tampão de solubilização. Por fim, foi adicionado aos poços 180  $\mu$ L de reagente Bradford. A curva padrão ficou com as seguintes concentrações de BSA: 1,4 mg/mL; 0,7 mg/mL; 0,35 mg/mL; 0,175 mg/mL; 0,0875 mg/mL; 0,04375mg/mL e 0,021875 mg/mL. Construída a curva, foram quantificadas as amostras. Para isso, foi aplicado em triplicata 10  $\mu$ L de amostra de proteína na placa e 10 $\mu$ L de tampão e adicionado 250  $\mu$ L de reagente Bradford. Também foi feito o branco, constituído de 10 $\mu$ L de tampão, que varia conforme a fração analisada, 10  $\mu$ L de água destilada e 250 $\mu$ L de reagente Bradford. A curva e as amostras ficaram em repouso, à temperatura ambiente, por 15 minutos. Decorrido esse tempo, foi feita a leitura da absorbância no comprimento de onda de 595 nm em espectrofotômetro. Assim, foi construída a curva de padronização, com as concentrações de BSA na abscissa e as absorbâncias médias na ordenada. Plotada no Excel, obtendo equação de ajuste linear, e feitas as medidas da absorbância da amostra de proteína (média das triplicatas), na qual pode calcular o valor da concentração de proteínas na amostra (variável —x|), substituindo o resultado da absorbância na equação linear resultante da curva padrão (variável —y|).

#### 4.6 Dosagem de proteínas pelo método de Densitometria

A quantificação de proteínas por densitometria é obtida pela medida da densidade óptica relativa da banda da proteína em SDS-PAGE 10%. Os géis de 10% de SDS poliacrilamida foram obtidos pela metodologia descrita no item 4.7 e após foi obtido um scanner pelo aplicativo CamScanner dispositivos Android, as imagens geradas foram armazenadas em modo JPG em tons de cinza e foram encaminhadas para o software ImageJ (SCHNEIDER *et al.*, 2012). Foi construída a curva de padronização, com as concentrações de BSA (0,1mg/mL, 0,2mg/mL, 0,4mg/mL e 0,8mg/mL) na abscissa e as absorbâncias médias na ordenada. Plotada no Excel, obtendo equação de ajuste linear, na qual pode calcular o valor da concentração de proteínas na amostra (variável  $x$ ), substituindo o resultado da absorbância na equação linear resultante da curva padrão (variável  $y$ ) (MCPHERSON *et. al.*, 2011).

#### 4.7 Análise de proteínas por SDS-PAGE e Western Blotting

A obtenção da proteína de interesse e análise do seu grau de pureza foi avaliada por SDS-PAGE e Western Blotting usando-se anticorpo monoclonal anti-His Tag. Os géis de 10% de SDS poliacrilamida (LAEMMLI, 1970) com 1,5 mm de espessura foram confeccionados e submetidos a uma corrente com voltagem 120 V, em um sistema de mini gel, Hoefer mini VE-Vertical electrophoresis System, da Amersham Pharmacia Biotech. Após a corrida, os géis foram corados com Coomassie Brilliant Blue de acordo com protocolos descritos na literatura (OAKLEY; KIRSCH; MORRIS, 1980). Foram aplicados 15 $\mu$ L da amostra em cada canaleta no gel, e utilizado um marcador de peso molecular para identificação das bandas.

A técnica de western blotting (TOWBIN *et al.*, 1979; TOWBIN; GORDON, 1984) foi usada para detectar a expressão da proteína rLicNTPDase-2. Cada gel possui um espelho, com a mesma concentração de proteínas totais descrita acima, com marcador de massa molecular de 250 kDa pré-corado (Bio-Rad). Para a transferência das proteínas do gel para membrana de nitrocelulose (Western Blotting) utilizou-se o sistema semi-seco, a 400 mA por 1 h, e após esse tempo, as membranas foram coradas com Ponceau S para confirmação da transferência (STOCHAJ, 2006). Em seguida, foram lavadas com água destilada rapidamente e incubadas com solução de bloqueio (PBS-Tween 1%, leite em pó desnatado 0,5%) overnight, sob agitação. No dia seguinte, a membrana foi lavada 3 vezes com PBS-T 1% por 5 min sob agitação, e incubada com anticorpo monoclonal primário anti-polihistina, (Sigma®, H1029), diluído 1:5000 em tampão PBS-T 1% e incubada por 1 h, sob agitação. Passado este tempo, a membrana foi lavada novamente com tampão PBS-T, como descrito anteriormente, e incubada

por 1 h com o anticorpo secundário anti-mouse- IgG de coelho, conjugado com peroxidase monoclonal (Sigma®, A9044) produzido em cabra, diluído 1:10.000 em tampão PBS-T 1%. Todo o processo foi realizado à temperatura ambiente. Por fim, as membranas foram lavadas com tampão PBS-T 1%, como já descrito, e a revelação foi realizada no escuro, utilizando-se a solução para revelação de atividade de peroxidase (10mg de DAB (Sigma, D12384), 1mL NiCl<sub>2</sub> (0,3%), 10mL de tampão Tris 100 mM pH 7,6, sendo adicionado por último 10µL de água oxigenada (30%). Assim que apareceram as bandas, a reação foi parada com água destilada e as membranas fotografadas e guardadas à temperatura ambiente.

#### **4.8 ELISA (Ensaio de imunoabsorção enzimática)**

O imunoenensaio ELISA foi realizado de acordo com De Souza e colaboradores (2013), com o propósito de avaliar a interação de antígeno-anticorpo da proteína recombinante. A rLicNTPDase2-Gold purificada foi utilizada para sensibilizar placas de 96 poços (Nunc MaxiSorp™) na concentração de 0,1 µg por poço. A sensibilização foi feita pela aplicação de 100 µL de solução de antígeno em cada poço e incubação da placa a 4 °C overnight. O bloqueio dos sítios inespecíficos foi realizado com solução de BSA 3% em PBS por 1 hora e as lavagens (4 vezes) foram feitas com PBS-T (PBS 1x; Tween20 0,05%). A incubação do antígeno e posteriormente a do anticorpo foram feitas a 37 °C, 100 RPM, e por 1 hora, e as lavagens realizadas 4 vezes com 200 µL de Tween 20® 0,05%, em PBS por poço. As amostras contendo o antígeno foram diluídas na proporção de 1:80 em BSA 1%, em PBS, e o anticorpo secundário (anti-IgG de cachorro produzido em coelho sigma A6792) foi utilizado na concentração de 1:5.000 diluído no mesmo tampão. A revelação foi realizada pela adição de 100 µL do substrato TMB (Sigma, T0440) por 5 minutos e interrompida usando 100 µL de ácido sulfúrico 0,5M. A leitura de absorbância foi feita a 492 nm, em leitora automatizada SpectraMax® M5 (Molecular Devices, Vale do Silício, Califórnia, Estados Unidos), cujo intervalo fotométrico é 0 – 4 ODs, com resolução de 0,001 OD.

O resultado expresso pela quantificação por espectroscopia de uma reação colorimétrica, podem ser usados diferentes antígenos, que definem a especificidade e sensibilidade da técnica. Foi calculado o cut-off somando os valores de sensibilidade e especificidade, e vendo o ponto em que é obtido o máximo do somatório entre sensibilidade e especificidade, como no método de Youden (YOU DEN; STEINER, 1975).

#### **4.9 Soroteca padronizada para imunoensaio diagnóstico de LVC.**

Para realização dos imunoensaio foi utilizado soroteca padronizada por nosso grupo de pesquisa. As amostras de soros foram obtidas da biblioteca de soros de cães do Dr. George Lins Machado-Coelho, da Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP, MG, Brasil). As amostras de soros positivos para CVL foram isoladas de cães naturalmente infectados de áreas endêmicas de LVC do Brasil (cidades do Governador Valadares, Caratinga, Janaúba, Belo Horizonte e São Luís do Maranhão). Essas amostras foram coletadas pelo Programa de Controle da Leishmaniose Visceral (VLMCP), segundo lei brasileira, nesta situação específica, não há necessidade de registro por um comitê de ética em experimentação animal. Os soros negativos foram obtidos de animais não infectados mantidos no canil da UFOP sob condições controladas. Todas as amostras de soro canino obtidas foram padronizadas por teste parasitológico e PCR (padrão ouro) e mantidas a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

#### **4.10 Teste rápido imunocromatográfico**

##### **4.10.1 Avaliação da adsorção da rLicNTPDase2-Gold ao ouro coloidal 40nm**

A otimização da conjugação Ouro-rLicNTPDase2-Gold foi realizada de acordo com Tang (2022) e metodologia descrita no protocolo cedido pela DCN Conjugation Services, com adaptações. Foi utilizado placa de 12 poços, sendo adicionado 200  $\mu\text{L}$  da solução de ouro coloidal (40nm colloidal gold) adquirida pela empresa diagnostic Consulting network, INC-DCN/ USA. Diferentes concentrações da proteína purificada (de 0 a 4,2  $\mu\text{g}$ ) foram adicionados à solução de ouro coloidal, sendo incubadas por 30 min. Decorrido o tempo, 20  $\mu\text{L}$  da solução de NaCl a 10% foi adicionada à mistura, e a concentração mínima de proteína que manteve o a cor vermelha no poço sem alteração foi considerada a ideal.

O pH da solução de mistura ouro coloidal e proteína foi ajustada com carbonato de potássio ( $\text{K}_2\text{CO}_3$  0,1 M), a fim de avaliar alterações nas condições de adsorção mediante alteração do pH. Para isso, foi escolhida a concentração mínima de proteína que manteve a cor vermelha, sendo essa 0,53  $\mu\text{g}$ . Em uma placa de 12 poços foram adicionados 200  $\mu\text{L}$  da solução de ouro coloidal (40nm colloidal gold – DCN, USA) a cada poço e 0,53  $\mu\text{g}$  de proteína a partir do poço 2, deixando assim o primeiro poço com ouro coloidal puro. A cada poço foi adicionado volumes variados (0-10  $\mu\text{L}$ ) de  $\text{K}_2\text{CO}_3$  0,1 M. A mistura foi incubada por 30 min e posteriormente revelada com 20  $\mu\text{L}$  da solução de NaCl a 10%. O pH ótimo foi definido como

o correspondente volume de  $K_2CO_3$  (0,1M) que manteve a cor da solução vermelha, sem alteração vermelha para azul/roxa, o que indica conjugação sem formação de agregados.

Para otimização da concentração de proteína ideal a adsorção ao ouro e avaliação da estabilidade da ligação mediante alteração do pH, além da observação visual da coloração vermelha ou azul/roxa, a conjugação ouro coloidal-antígeno foi confirmada por espectro de absorção UV-visível para analisar o pico de absorbância das misturas em faixa de 400–900 nm. Sendo que quando o pico máximo de absorção da mistura apresenta um deslocamento em relação a absorbância do ouro coloidal puro, indica que ocorreu a conjugação. Já no teste de estabilidade da ligação mediante alteração do pH, quando ocorre formação de agregados indica que a ligação não está estável na condição testada, assim ocorre alargamento dos picos de absorção e uma diminuição das intensidades do pico (TANG, 2022; CYTODIAGNOSTICS Inc., 2023).

#### **4.10.2 Teste de Funcionalização**

##### **4.10.2.1 Padronização do tipo de Membrana de Nitrocelulose (MN)**

A membrana de nitrocelulose (MN) apresenta diferentes porosidades especificadas pelo fabricante HI Flow Plus (Merck Millipore Ltda.) que expressa o tempo de fluxo capilar (TFC) com uma relação de deslocamento do fluido por tempo em segundos a cada 4 cm da membrana (s/ 4 cm), assim membranas com menor porosidade apresentam o TFC maior e consequentemente a taxa de fluxo será menor e a sensibilidade será maior. As membranas de nitrocelulose HI Flow Plus (Merck Millipore Ltda.) nas porosidades HF 090, HF 120, HF 135 e HF 180 foram cortadas nas dimensões 4,0 cm x 0,5 cm. Procedeu-se à imobilização do Anti-dog IgG (H+L) (Kirkegaard & Perry Laboratories, Inc. USA) aplicando-se o volume 3 $\mu$ L correspondente à massa desejada de proteína (3 $\mu$ g), formando uma gota centralizada sobre as fitas de nitrocelulose e as incubando por 30 minutos a 37 °C. Decorrido o tempo o imobilizado foi desafiado com os tampões de corrida Tris-HCL 25mM, pH 7,5; PBS tween 0,05% pH 8,0; PBS tween 0,1% pH 8,0 e PBS pH 8,0. Para revelação, utilizou-se a coloração direta de proteínas com Ponceau S (0,1% (m/v) em ácido acético 5%), na qual as fitas ficaram submersas no corante por um minuto e lavadas em água destilada para observação dos spots.

##### **4.10.2.2 Desenvolvimento do teste imunocromatográfico de fluxo lateral (LFA)**

As membranas HI Flow Plus HF 135 (Merck Millipore Ltda.) foram cortadas nas dimensões 2,6 cm x 0,3 cm. As tiras foram preparadas com dois modelos de componentes

reativo, um contendo o anti-dog IgG (modelo 1) e outra a rLicNTPDase2-Gold (modelo2) imobilizado na área teste. Na linha teste foi imobilizado o componente reativo aplicando o volume 3µL correspondente à massa de 3µg de anti-dog IgG (H+L) (Kirkegaard & Perry Laboratories, Inc. USA) e 1,30 µg da rLicNTPDase2-Gold formando uma gota sobre a área teste, para controle aplicou-se o volume correspondente à massa desejada de IgG (2,5µg), também formando uma gota. As membranas foram incubadas por 30 minutos a 37 °C (De Souza, 2016). Após secagem as membranas foram bloqueadas com solução de BSA 3% em PBS pH 8, por 1 hora, em seguida realizado três lavagens de 5 min com PBS pH 8.

O conjugado foi produzido de duas formas, primeiramente como padronização e descrito no item 4.10.1. Para segunda forma foi utilizado o tampão borato como alternativa para desprender o conjugado da fibra de vidro, aumentar sua estabilidade e promover a corrida uniforme da amostra. O tampão borato pH 8,0 apresenta ação tensoativa auxiliando a solubilização do conjugado aos analitos da amostra, e em pH 8,0 apresenta-se mais básico em relação ao PI (7,63) da rLicNTPDase2-Gold que teoricamente expõe seus grupos hidrofóbicos favorecendo a adsorção ao ouro coloidal e aumentando a estabilidade do conjugado. Assim, após preparar o conjugado segundo o item 4.10.1, o mesmo foi boqueado por 30 minutos com solução borato 50mM 10% BSA pH 8, após foi centrifugação 14000g a 4°C por 25 min. O sobrenadante foi descartado e o pellet suspenso em tampão borato 50mM, 1% BSA, pH 8 na diluição de 1:10, sendo aplicado 40 µL do conjugado na fibra de vidro 1,4 cm x 0,3 cm e incubado a 37 °C por 2 horas para secagem. Para confirmar a adsorção foi realizada leitura a 540nm, com absorvância 521-526 e analisada a formação de um pico.

A proteína A conjugada com ouro coloidal 40 nm (Fitzgerald industries internacional INC.) utilizada para revelar o controle e o imobilizado rLicNTPDase2-Gold na área teste, foi adicionada a fibra de vidro à uma concentração de 0,0024µg/mL e volume de 40 µL, sendo incubada por 30 minutos a 37 °C até a completa secagem do conjugado (De SOUZA, 2016).

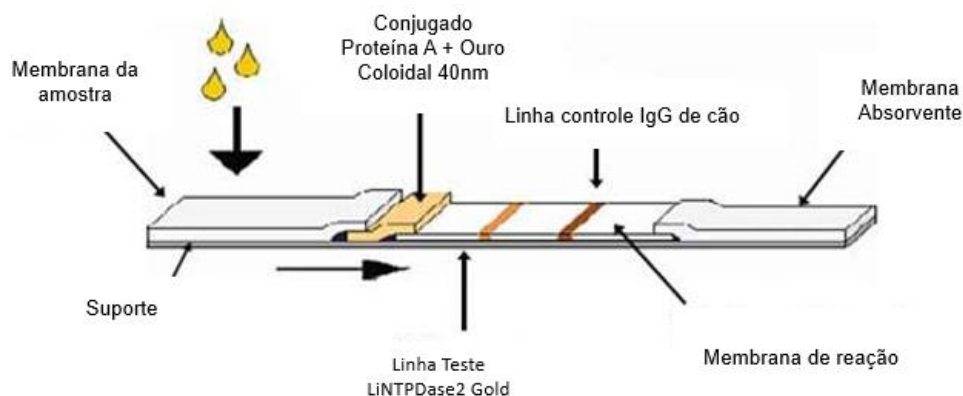
As tiras do teste rápido foram montadas e após inseridas no cassete plástico, primeiramente as fitas foram cortadas em dimensões específicas para permitir a sobreposição entre as membranas e ocupar o espaço total de 6 cm, o filtro de adsorção foi colocado na extremidade da membrana de nitrocelulose a 5mm da linha controle, a fibra de vidro foi adicionada na outra extremidade, próximo à linha teste. Os cassetes foram armazenados entre 2-4°C. Foram testados os tampões de corrida, Tris-HCL 25mM pH 7,5; PBS tween 0,05% pH 8,0 e PBS pH 8,0 para avaliar a interferência de detergentes e surfactantes sobre o fluxo capilar,

e sobre o arraste do conjugado ao longo da membrana, uma vez que essas soluções podem afetar a deposição dos reagentes, sensibilidade do ensaio, especificidade e uniformidade do imobilizado (MILLIPORE, 2015).

Para avaliar a aplicabilidade da rLicNTPDase2-Gold como antígeno em imunodiagnóstico foram usados soros de cães positivos e negativos para LVC, disponíveis na soroteca do nosso grupo de pesquisa (descrita no item 4.9), na diluição 1:80 adicionando um volume de 80 $\mu$ L ao poço de aplicação da amostra no cassete plástico. A formação de uma marcação vermelha circular indica um resultado reagente (positivo) e ausência dessa marcação um resultado não reagente (negativo). No presente teste não foi possível estabelecer uma marcação em linha, devido à falta de equipamentos que permitam a aplicação do imobilizado nesse formato. As figuras 6 e 7 esquematizam os modelos 1 e 2 utilizados para o desenvolvimento das tiras testes.



**Figura 6 - Diagrama esquemático de uma tira de LFIA - modelo 1.** Agente de reação da linha teste Anti- IgG de cão e conjugado rLicNTPDase2-Gold + ouro coloidal 40nm Fonte: Adaptada de O'FARRELL, 2013.



**Figura 7 - Diagrama esquemático de uma tira de LFIA - modelo 2.** Agente de reação da linha teste rLicNTPDase2-Gold e conjugado Proteína A + ouro coloidal 40nm Fonte: Adaptada de O'FARRELL, 2013.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Expressão heteróloga da proteína LicNTPDase2-Gold

A construção pET11a-rLicNTPDase2-Gold foi otimizada por mudanças na sequência original da proteína rLicNTPDase-2, sendo adicionado um peptídeo específico para estabilização de ligação da proteína ao ouro coloidal (LÉVY, *et al.* 2004), com intuito de aumentar a eficácia do protótipo de imunoensaio cromatográfico rápido de fluxo lateral. Os parâmetros de expressão inicialmente testados foram embasados em De Souza, R. (2013), e para obter maior rendimento de expressão de proteína, diferentes condições de tempo e temperatura foram avaliados em sistema bacteriano de expressão em *E. coli*, esse sistema é amplamente utilizado por indústrias de biotecnologia devido ao rápido crescimento do micro-organismo, alto rendimento do produto, baixo custo e facilidade de manipulação genética, o que permite produção em larga escala de proteínas recombinantes, particularmente as não glicosiladas (BAESHEN *et al.*, 2015).

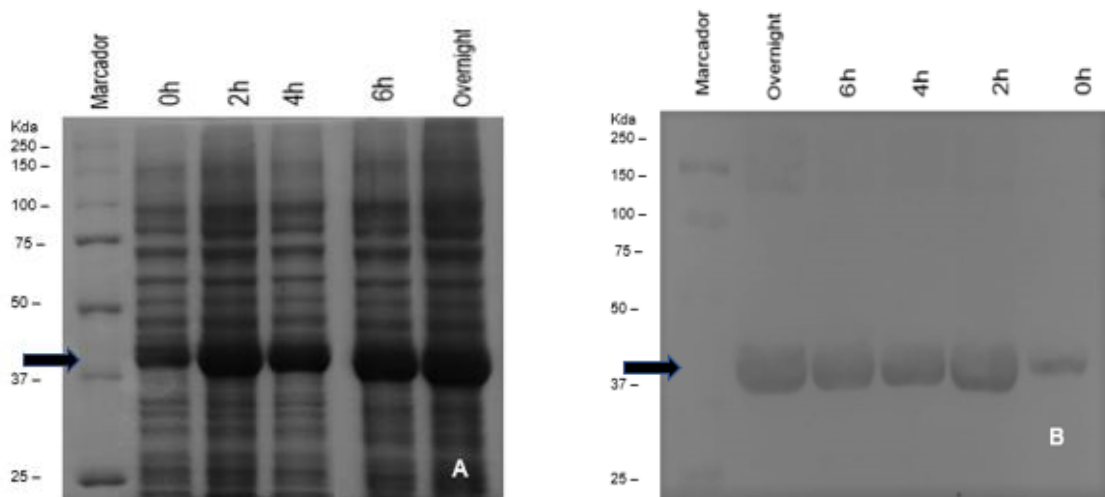
Trabalho anterior do grupo demonstrou por imunoensaio por ELISA que a utilização de proteínas renaturadas não se mostrou mais eficaz do que a proteína desnaturada para o reconhecimento antígeno (rLiNTPDase-2): anticorpo, assim a conformação do antígeno não interfere na interação e resultado do ensaio diagnóstico, o que possivelmente viabiliza a utilização da proteína rLicNTPDase2-Gold na forma insolúvel para confecção do teste rápido (De SOUZA, 2016). Baseado nessas informações e na construção da nova proteína recombinante que apresenta o promotor T7, as cepas testadas neste trabalho na parte de expressão foram *E. coli* BL21 (DE3) RIL e C41 (DE3).

*E. coli* BL21 produz RNA polimerase para o promotor T7, sendo uma cepa de escolha comum para expressão quando o gene está inserido em um vetor contendo esse promotor. Já a *E. coli* C41 (DE3) derivada da BL21 (DE3) é indicada para expressão de proteínas de membrana incluindo aquelas que apresentam toxicidade, por apresentar o promotor lacUV5, onde a expressão desse tipo de proteína é favorecida, pois diminui a produção de T7 RNA polimerase reduzindo a taxa de transcrição da proteína de membrana evitando a supreexpressão que leva a agregação das proteínas no citoplasma (KAUR, *et al.* 2018).

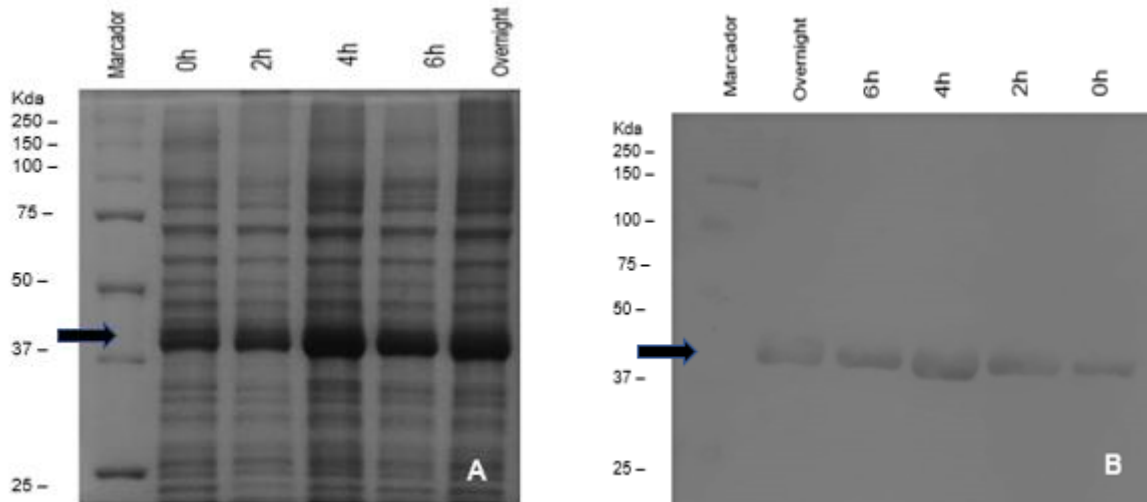
Em análise feita em SDS-PAGE 10% foi possível verificar em relação a expressão nas condições 37°C, tempos 0h, 2h, 4h, 6h e overnight, 180 RPM, uma banda forte na altura correspondente à massa molecular esperada da proteína rLicNTPDase2-Gold (44 kDa), (figura

8a). Esta hipótese foi confirmada por western blot (WB) utilizando anticorpo primário anti-hexahistidina (figura 8b), sendo verificado um aumento de expressão ao longo do tempo, porém no tempo 2 h já é possível obter uma quantidade significativa de proteína. Nas condições 30°C, tempos 0h, 2h, 4h, 6h e overnight, houve expressão em todos os tempos com quantidade significativa em 4h como apresentado no SDS-PAGE 10% e confirmado por WB (figura 9). Já nas condições de 20°C, tempos 0h, 2h, 4h, 6h e overnight, a expressão ocorreu apenas em 6h/overnight (figura 10). Nesses experimentos em relação à temperatura, a maior expressão da proteína recombinante a 37 °C pode ter ocorrido pela superexpressão, como a mesma possui um promotor forte no vetor, a elevação da temperatura leva a condições de alta expressão com tendência a formação de agregados em velocidade frequentemente muito maior que o enovelamento, com formação de corpos de inclusão, em temperaturas menores como 30°C e 20°C ocorrerá redução nos níveis de expressão, onde uma menor velocidade favorece o enovelamento da proteína na conformação solúvel (NASCIMENTO, 2016).

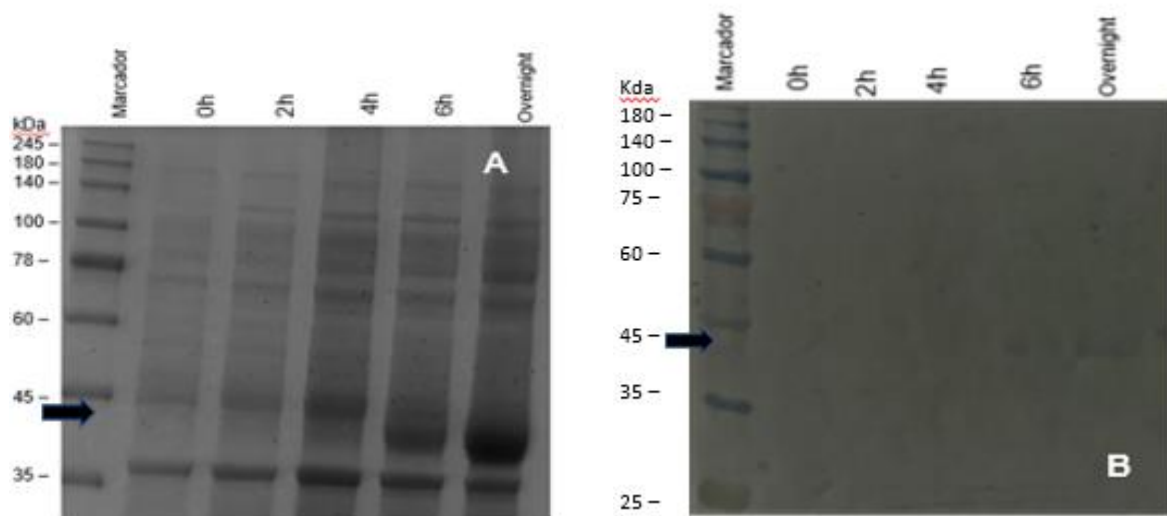
Mediante as análises, considerando a concentração da proteína e a otimização do tempo de expressão e o fato da conformação nativa não ser obrigatória para o desenvolvimento do teste rápido, foi padronizado baseado na análise do extrato total, os parâmetros 37°C, 2 horas. A partir dessa definição foram realizadas novas induções com maiores volumes para análise da concentração de proteína solúvel e nos corpos de inclusão e posterior purificação.



**Figura 8: Verificação do melhor tempo de expressão da rLicNTPDase2-Gold em BL21 (DE3) 37°C.** (A) SDS-PAGE em gel de poliacrilamida 10% corado com azul de coomassie, aplicado 15µL das amostras de extrato total de lisado de *E. coli* BL21 (DE3) com indução 37°C, 180 RPM, 25mL. Coletada 0h após atingir O<sub>600</sub> 0,6 e 2h, 4h, 6h e Overnight após a adição de imidazol 0,2 mM ao tempo 0h. Na canaleta Marcador temos o padrão de massa molecular de 250 kDa (Bio-Rad). (B) O Western blotting (WB) foi feito a partir de gel espelho mostrado na parte esquerda da Figura (A). Foi usado anticorpo primário anti-His monoclonal (Sigma®) na diluição 1:5000 e, como anticorpo secundário, anti-IgG de camundongo conjugado com Peroxidase (Sigma®) (1:10 000). Fonte: Dados da pesquisa.



**Figura 9: Verificação do melhor tempo de expressão da rLicNTPDase2-Gold em BL21 (DE3) 30° C.** (A) SDS-PAGE em gel de poliacrilamida 10% corado com azul de coomassie, aplicado 15µL das amostras de extrato total de lisado de *E. coli* BL21 (DE3) com indução 30°C, 180 RPM, 25mL. Coletada 0h após atingir  $O_{600}$  0,6 e 2h, 4h, 6h e Overnight após a adição de imidazol 0,2 mM ao tempo 0h. Na canaleta Marcador temos o padrão de massa molecular de 250 kDa (Bio-Rad). (B) O Western blotting (WB) foi feito a partir de gel espelho mostrado na parte esquerda da Figura (A). Foi usado anticorpo primário anti-His monoclonal (Sigma®) na diluição 1:5000 e, como anticorpo secundário, anti-IgG de camundongo conjugado com Peroxidase (Sigma®) (1:10 000). Fonte: Dados da pesquisa.

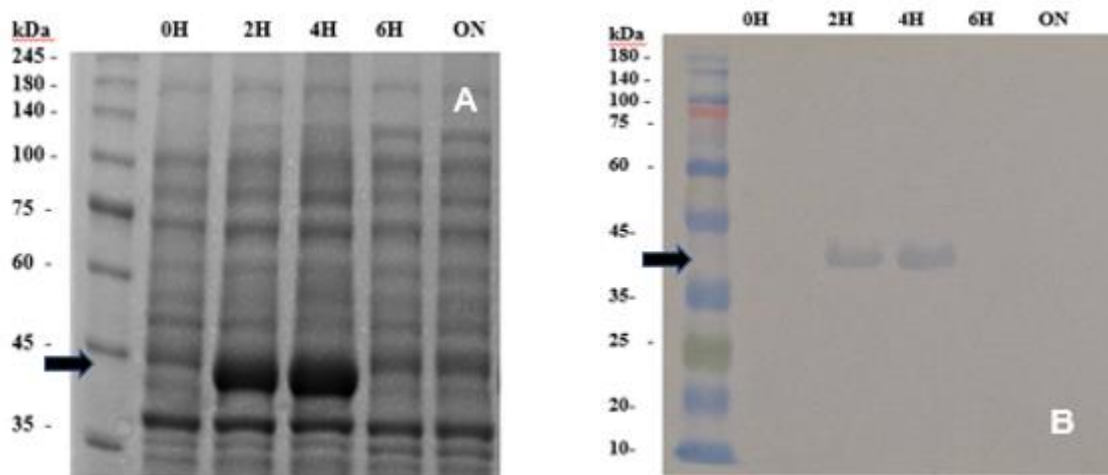


**Figura 10: Verificação do melhor tempo de expressão da rLicNTPDase2-Gold em BL21 (DE3) 20° C.** (A) SDS-PAGE em gel de poliacrilamida 10% corado com azul de coomassie, aplicado 15µL das amostras de extrato total de lisado de *E. coli* BL21 (DE3) com indução 20°C, 180 RPM, 25mL. Coletada 0h após atingir  $O_{600}$  0,6 e 2h, 4h, 6h e Overnight após a adição de imidazol 0,2 mM ao tempo 0h. Na canaleta Marcador temos o padrão de massa molecular TrueColor High Range Protein Marker (10-245 kDa). (B) O Western blotting (WB) foi feito a partir de gel espelho mostrado na parte esquerda da Figura (A). Foi usado anticorpo primário anti-His monoclonal (Sigma®) na diluição 1:5000 e, como anticorpo secundário, anti-IgG de camundongo conjugado com Peroxidase (Sigma®) (1:10 000). Marcador temos o padrão de massa molecular TrueColor High Range Protein Marker (10-245 kDa). Fonte: Dados da pesquisa

A expressão em *E. coli* C41 (DE3) foi realizada com intuito de verificar se era possível conseguir rendimentos mais estáveis de proteína, pois inicialmente os testes em BL21(DE3)

RIL se mostraram promissores, mas em induções posteriores a cepa não apresentava crescimento em pré-inoculo e quando havia crescimento, não ocorria expressão da proteína recombinante.

Os testes em C41 (DE3) nas condições de temperatura de 37°C e tempos 0h, 2h, 4h, 6h e overnight e agitação a 180 RPM, analisada em SDS-PAGE 10% e wester blotting (WB), apresentou uma banda forte nos tempos 2h e 4 h (Figura 11) na altura correspondente à massa molecular da proteína rLicNTPDase2-Gold (44 kDa), sendo confirmada. O tempo de indução influencia na qualidade e quantidade da expressão de proteínas. Ao longo do tempo em um meio nutritivo haverá formação da proteína alvo e de metabolitos secundários e surgimento de toxicidade e escassez de nutrientes que leva o acúmulo de produtos gerados pelo sistema e redução da expressão da proteína de interesse (NASCIMENTO, 2016). Assim, visando otimização do tempo e considerando a concentração da proteína foi estabelecido o tempo de 2 horas como padrão para próximas induções.

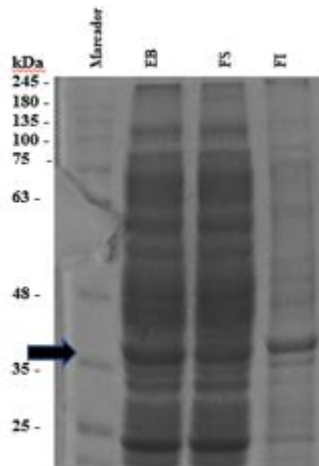


**Figura 11: Verificação do melhor tempo de expressão da rLicNTPDase2-Gold em C41 (DE3) 37°C.** (A) SDS-PAGE em gel de poliacrilamida 10% corado com azul de coomassie, aplicado 15µL das amostras de extrato total de lisado de *E.coli* C411 (DE3) com indução 37°C, 180 RPM, 150mL. Coletada 0h após atingir  $O_{600}$  0,6 e 2h, 4h, 6h e Overnight após a adição de imidazol 0,2 mM ao tempo 0h. Na canaleta Marcador temos o padrão de massa molecular TrueColor High Range Protein Marker (10-245 kDa). (B) O Western blotting (WB) foi feito a partir de gel espelho mostrado na parte esquerda da Figura (A). Foi usado anticorpo primário anti-His monoclonal (Sigma®) na diluição 1:5000 e, como anticorpo secundário, anti-IgG de camundongo conjugado com Peroxidase (Sigma®) (1:10 000). Fonte: Dados da pesquisa.

## 5.2 Avaliação da expressão na fração solúvel e nos corpos de inclusão

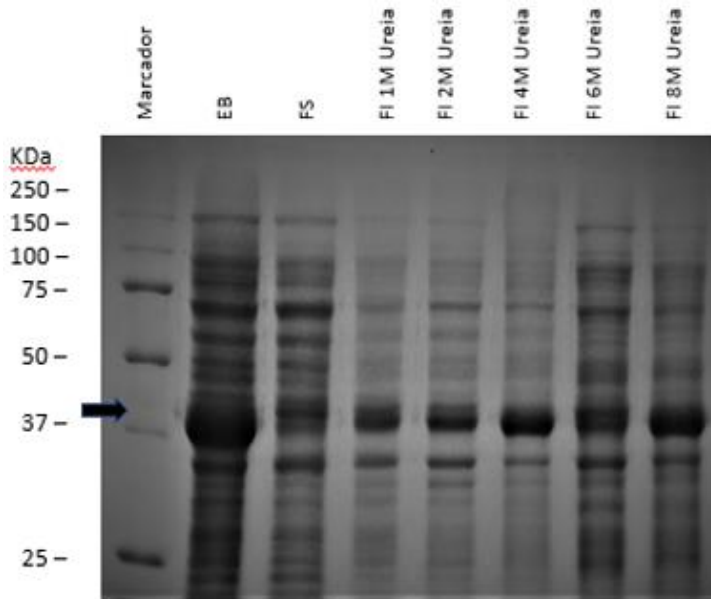
A partir do pellet da expressão em *E. coli* BL21 (DE3) RIL e lise utilizando o protocolo L1 descrito no item 4.4.2, foi possível verificar em relação a expressão nas condições padronizadas 37°C, tempos 2h presença de proteína na fração solúvel e nos corpos de inclusão, como observado na (figura 12). O protocolo foi baseado em De Souza (2013), onde a utilização

de altas concentrações de uréia, um agente caotrópico, favorece a solubilização ao desnaturar e dissolver os agregados proteicos nos corpos de inclusão. O tampão Carbonato 0,05M pH 9,6 foi escolhido por ser um dos tampões referência para confecção das tiras de LFIA e apresenta o pH dentro da faixa tamponante (pH 9,2 a 10,6) e fora do ponto isoelétrico (PI) da proteína em estudo (7,63).



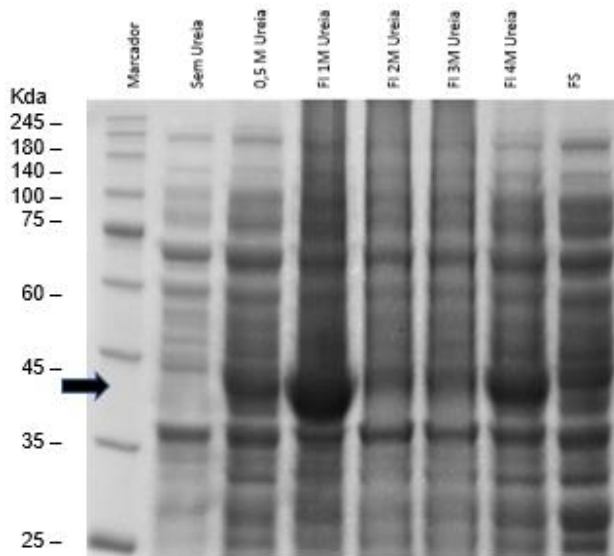
**Figura 12: Análise da solubilidade da rLicNTPDase2-Gold expressa em BL21 (DE3) 37 ° C.** SDS-PAGE em gel de poliacrilamida 10% corado com azul de coomassie, Amostras obtidas em pellet de 400mL expressão em *E. coli* BL21 (DE3), indução 37°C, 180 RPM. Foi aplicado 15µL das amostras: Extrato total de lisado (EB), Fração solúvel (FS) e Fração insolúvel (FI), solubilização em tampão Carbonato e Ureia 8M. Na canaleta Marcador temos o padrão de massa molecular TrueColor High Range Protein Marker (10-245 kDa). Fonte: Dados da pesquisa.

Os pellets da expressão em *E. coli* C41 (DE3) e lise utilizando o protocolo L2 e L3 descrito no item 4.4.2, ao qual foi avaliada a solubilização em variadas concentrações de Ureia, foi possível verificar em SDS – PAGE 10% (figura 13) em relação a expressão nos parâmetros escolhidos 37°C, tempos 2h, que as amostras obtidas por lise protocolo L2, apresentaram proteína solúvel e maior concentração de proteínas insolúveis, o que pode ser justificado pelo acúmulo de proteína traduzida em seu estado desdobrado. A superexpressão gera proteínas não enoveladas que se acumulam no citoplasma cujo ambiente redutor inibe a formação de ligações dissulfeto formando agregados insolúveis em corpos de inclusão. (NASCIMENTO, 2016). A solubilização das proteínas nos corpos de inclusão, utilizando tampão contendo ureia 8M apresentou melhor concentração evidenciado pela banda forte na altura correspondente a proteína alvo (44 kDa), como destacado na figura 13. Como esperado e semelhante ao ocorrido em L1, a alta concentração de ureia desnaturou e dissolveu os agregados proteicos nos corpos de inclusão, favorecendo a solubilização e recuperação das proteínas insolúveis.



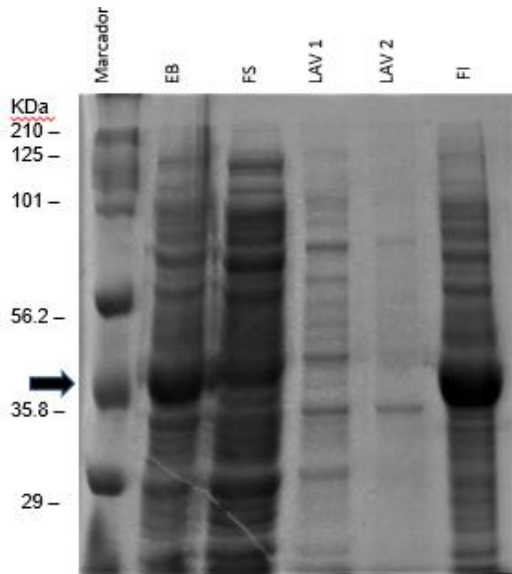
**Figura 13: Análise da solubilidade da rLicNTPDase2-Gold em diferentes concentrações de Ureia em tampão Carbonato.** SDS-PAGE em gel de poliacrilamida 10% corado com azul de coomassie, aplicados 15  $\mu$ L de amostra em cada canaleta. Na canaleta M temos o padrão de massa molecular de 250 kDa (Bio-Rad). As amostras foram obtidas por indução no tempo de 2h após a adição de 0,2 mM de IPTG,  $O_{600}$  0,6 temperatura de 37°C e agitação 180 RPM. Foi coletado o extrato total do lisado (EB) e Fração solúvel (FS). Estas amostras foram submetidas à lise em tampão carbonato, em diferentes concentrações de ureia 1M, 2M, 4M, 6M e 8M.

Já as amostras obtidas por lise protocolo L3, este realizado com intuito de aumentar a recuperação das proteínas nos corpos de inclusão a partir da utilização de baixas concentrações de ureia e favorecer uma maior concentração do purificado ao evitar a etapa de diálise que gera precipitações de proteínas, sendo essa realizada para remoção do agente caotrópico em altas concentrações. A melhor condição de solubilização foi observada com a concentração de ureia 1M, onde pode ser observado na figura 14 uma maior recuperação da proteína na altura de 44kDa, referente a proteína alvo. Baixas concentrações de ureia combinada com um processo de congelamento e descongelamento em pH alcalino são fatores essenciais para alta solubilização de corpos de inclusão, isso ocorre pois o pH alcalino do tampão de lise distante do ponto isoelétrico da proteína gera desestabilização do agregado de corpos de inclusão, a ureia promove a separação física das moléculas, interrompendo interações hidrofóbicas de moléculas de proteína e o congelamento induz a dissociação de proteínas por tensões e estresse causados por temperatura fria e cristais de gelo, assim as grandes proteínas são propensas à dissociação prevenindo sua estrutura secundária (QI *et. al.*, 2015).

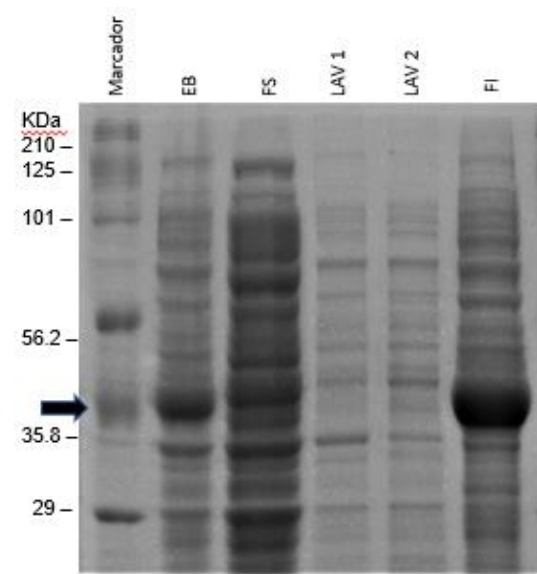


**Figura 14: Análise da solubilidade da rLicNTPDase2-Gold em diferentes concentrações de Ureia em tampão Carbonato - Protocolo de congelamento.** SDS-PAGE em gel de poliacrilamida 10% corado com azul de coomassie, aplicados 15  $\mu$ L de amostra em cada canaleta. Na canaleta M temos o padrão de massa molecular True Color High Range Protein Marker (245 kDa). As amostras foram obtidas por indução no tempo de 2h após a adição de 0,2 mM de IPTG,  $O_{600}$  0,6 temperatura de 37°C e agitação 180 RPM. Foi coletado o extrato total do lisado (EB) e Fração solúvel (FS). Estas amostras foram submetidas ao protocolo de congelamento (L3) lise em tampão carbonato, em diferentes concentrações de ureia 0M, 0,5M, 1M, 2M, 3M e 4M.

O Protocolo de congelamento e descongelamento denominado L3 foi eficiente para recuperação do solubilizado dos corpos de inclusão em baixas concentrações de ureia (1M), porém é possível verificar presença de muitos contaminantes no solubilizado (figura 14) o que influencia na etapa de purificação, portanto os protocolos de lise L5 e L6 (descritos no item 4.4.2) foram testados com a finalidade de alcançar maior pureza qualitativa da proteína alvo na etapa de lise beneficiando o processo de purificação ao eliminar da amostra as proteínas que não são de interesse. Em L5 (figura 15) as duas etapas de lavagens removeram proteínas sem comprometer o rendimento do solubilizado, porém não houve mudança significativa em relação a pureza, o mesmo pode ser observado em L6 (figura 16), apesar das etapas de lavagens removerem maior quantidade de proteína em relação a L5, também não houve maior pureza qualitativa no solubilizado. Para avaliar a contribuição dessa etapa para o processo de purificação, ambas amostras foram submetidas a purificação automatizada em FPLC.



**Figura 15: Análise da solubilidade da rLicNTPDase2-Gold, protocolo L5.** SDS-PAGE em gel de poliacrilamida 10% corado com azul de coomassie, Amostras obtidas em pellet de 400mL expressão em *E.coli* BL21 (DE3), indução 37°C, 180 RPM. Foi aplicado 15µL das amostras: Extrato total de lisado (EB), Fração solúvel (FS) e Fração L1 (1ª lavagem) solubilização em tampão Carbonato, Fração L2 (2ª lavagem) solubilização em tampão Carbonato e Fração Insolúvel solubilização em tampão Carbonato e Ureia 1M. Na canaleta Marcador temos o padrão de massa molecular Sigma, 10 -20% tris-Tricini, Sigma (210 kDa). Fonte: Dados da pesquisa



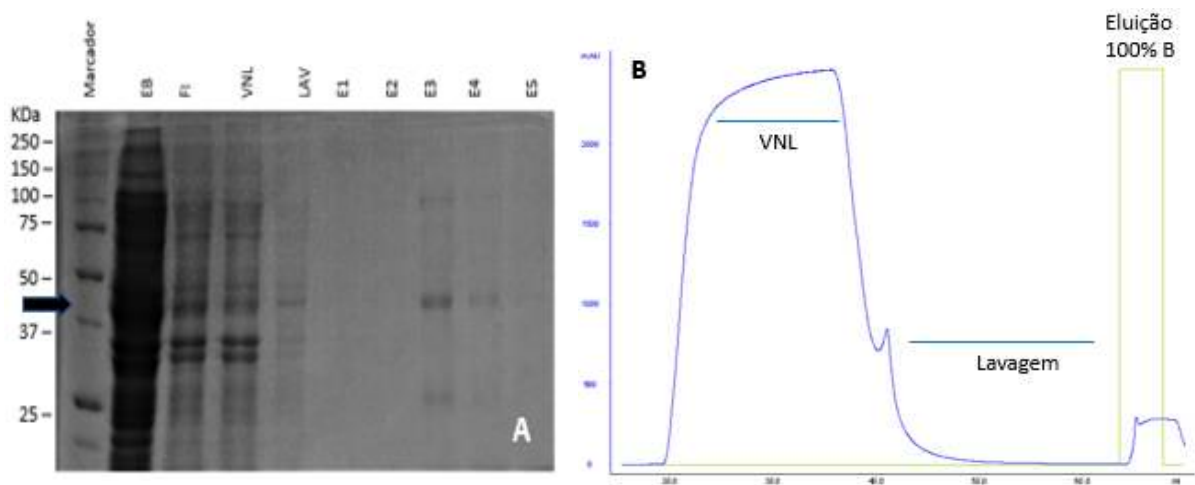
**Figura 16: Análise da solubilidade da rLicNTPDase2-Gold, protocolo L6.** SDS-PAGE em gel de poliacrilamida 10% corado com azul de coomassie, Amostras obtidas em pellet de 400mL expressão em *E.coli* BL21 (DE3), indução 37°C, 180 RPM. Foi aplicado 15µL das amostras: Extrato total de lisado (EB), Fração solúvel (FS) e Fração L1 (1ª lavagem) solubilização em tampão Carbonato, Fração L2 (2ª lavagem) solubilização em tampão Carbonato e congelamento e Fração Insolúvel solubilização em tampão Carbonato e Ureia 1M. Na canaleta Marcador temos o padrão de massa molecular Sigma, 10 -20% tris-Tricini, Sigma (210 kDa). Fonte: Dados da pesquisa.

### 5.3 Purificação automatizada em FPLC utilizando a coluna HisTrap FF crude

A escolha da melhor técnica de purificação, baseou-se em combinadas análises qualitativas (pureza) e quantitativas (concentração). A pureza é relativa à intensidade da banda específica da proteína rLicNTPDase2-Gold, que deve ser prevalente em relação às demais bandas, portanto, quando a banda da proteína alvo é mais abundante em relação às outras indica maior pureza, porém a presença de muitas outras bandas não desejadas demonstra uma baixa pureza qualitativa que se torna mais significativa quando a banda da proteína de interesse é pouco representada. Já a análise quantitativa avalia a concentração que está relacionado ao quanto de proteína total foi produzido por litro de indução. Em relação a essa análise outro parâmetro deve ser considerado, visto que a proteína rLicNTPDase2-Gold será utilizada para o desenvolvimento do LFIA, e para isso é sugerido uma concentração de proteína superior a 0,5 mg/mL. Assim, ao combinar análises qualitativas e quantitativas é possível estabelecer a melhor metodologia de purificação da proteína.

O primeiro protocolo testado, esse denominado P1 (descrita no item 4.4.3), apresentou uma recuperação total do purificado na concentração 0,69952 mg/mL avaliado pelo método de Bradford. Em relação a pureza nas canaletas referentes às frações da eluição (Figura 17), observa-se a predominância da banda com massa molecular de aproximadamente 44 kDa, compatível com a rLicNTPDase2-Gold, indicando pureza qualitativa da amostra. Observa-se também maior intensidade desta banda na fração 3 e perda de proteína alvo no VNL e na etapa de lavagem que pode ser explicada pela concentração de Imidazol 10 mM do tampão de lavagem que reduziu a interação da resina com a proteína alvo, porém essa concentração dificultou ligações inespecíficas que resultou em uma pureza qualitativa.

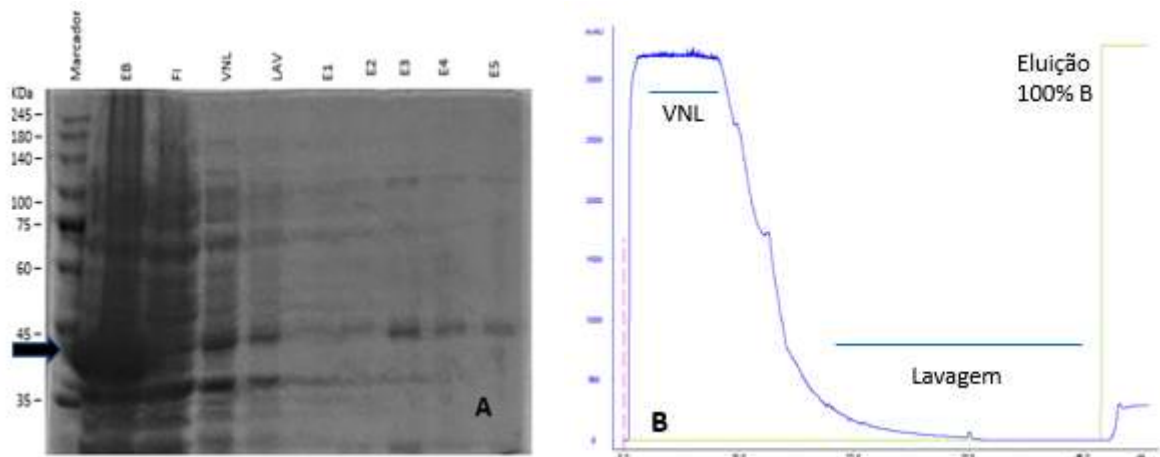
A purificação do solubilizado dos corpos de inclusão, foi monitorada por meio da absorbância em 280 nm, pode-se observar a formação de um platô durante a etapa de lavagem, correspondente às proteínas presentes no volume não ligado (VNL) e, a partir do início da eluição, observa-se um pequeno pico, o qual corresponde a frações de 1 mL denominada E3.



**Figura 17: Análise da purificação da rLicNTPDase2-Gold do corpo de inclusão – Protocolo P1.** (A) As amostras de indução foram coletadas extrato total de lise (EB) e uma alíquota antes da injeção (FI) (protocolo L1). Durante a purificação em FPLC coletou-se o volume não ligado (VNL), a lavagem (LAV) e as eluições (E1 a E5) em 100% de tampão B. As amostras foram submetidas à técnica de SDS-PAGE em gel de poliacrilamida 10% corado com azul de coomassie, sendo aplicados 15  $\mu$ L de proteínas totais em cada canaleta, utilizando-se o padrão de massa molecular de 250 kDa (Bio-Rad). (B) Cromatograma da purificação de rLicNTPDase2-Gold do corpo de inclusão. Após a ingestão da amostra coletou o volume não ligado e foi feita lavagem utilizando tampão Carbonato pH 9,6 (tampão A) e eluição com 100% de tampão B: 300 mM. Fonte: Dados da pesquisa

No protocolo P2 (descrita no item 4.4.3), esse realizado com solubilizado dos corpos de inclusão obtidos pela cepa C41(DE3) e mantendo os demais parâmetros de purificação de P1, em quantificação pelo método de Bradford para o purificado total apresentou uma concentração de 0,6431 mg/mL e em análise SDS-PAGE 10% pode-se observar uma alta pureza das amostras

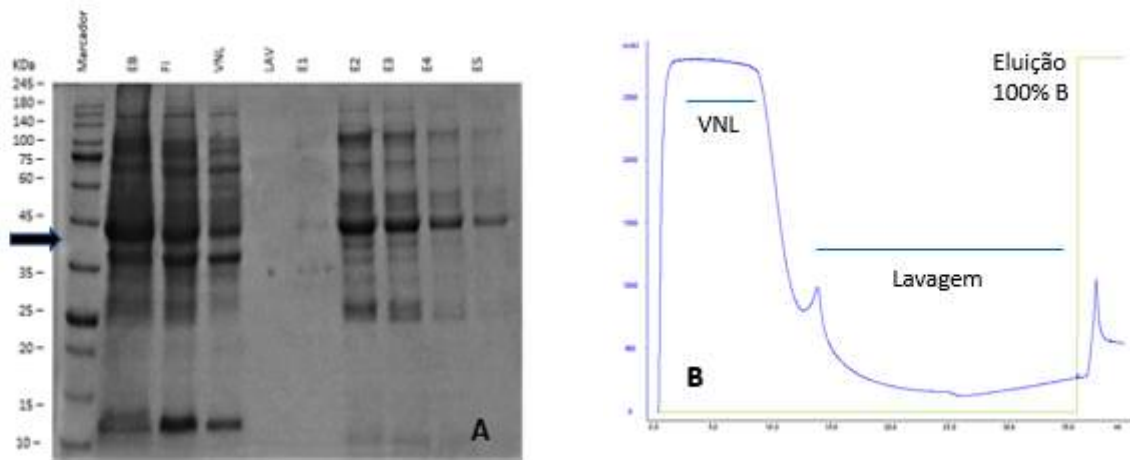
devido a predominância da banda referente a proteína alvo. Assim como em P1 houve perda de proteína no VNL e ao analisar o cromatograma de purificação observa-se um comportamento semelhante na etapa de eluição com a formação de um pequeno pico (figura 18), pois provavelmente não ocorreram mudanças conformacionais na proteína expressa pelas diferentes cepas de *E. coli*, evidenciando ainda a necessidade de modificação nesse protocolo para obtenção de maiores rendimentos da proteína purificada.



**Figura 18: Análise da purificação da rLicNTPDase2-Gold do corpo de inclusão – Protocolo P2.** (A) As amostras de indução foram coletadas extrato total de lise (EB) e uma alíquota antes da injeção (FI) (protocolo L2). Durante a purificação em FPLC coletou-se o volume não ligado (VNL), a lavagem (LAV) e as eluições (E1 a E5) em 100% de tampão B. As amostras foram submetidas à técnica de SDS-PAGE em gel de poliacrilamida 10% corado com azul de coomassie, sendo aplicados 15  $\mu$ L de proteínas totais em cada canaleta, utilizando-se o padrão de massa molecular de TrueColor High Range Protein Marker (245 kDa). (B) Cromatograma da purificação de rLicNTPDase2-Gold do corpo de inclusão. Após a ingestão da amostra coletou o volume não ligado e foi feita lavagem utilizando tampão Carbonato pH 9,6 (tampão A) e eluição com 100% de tampão B: 300 mM. Fonte: Dados da pesquisa

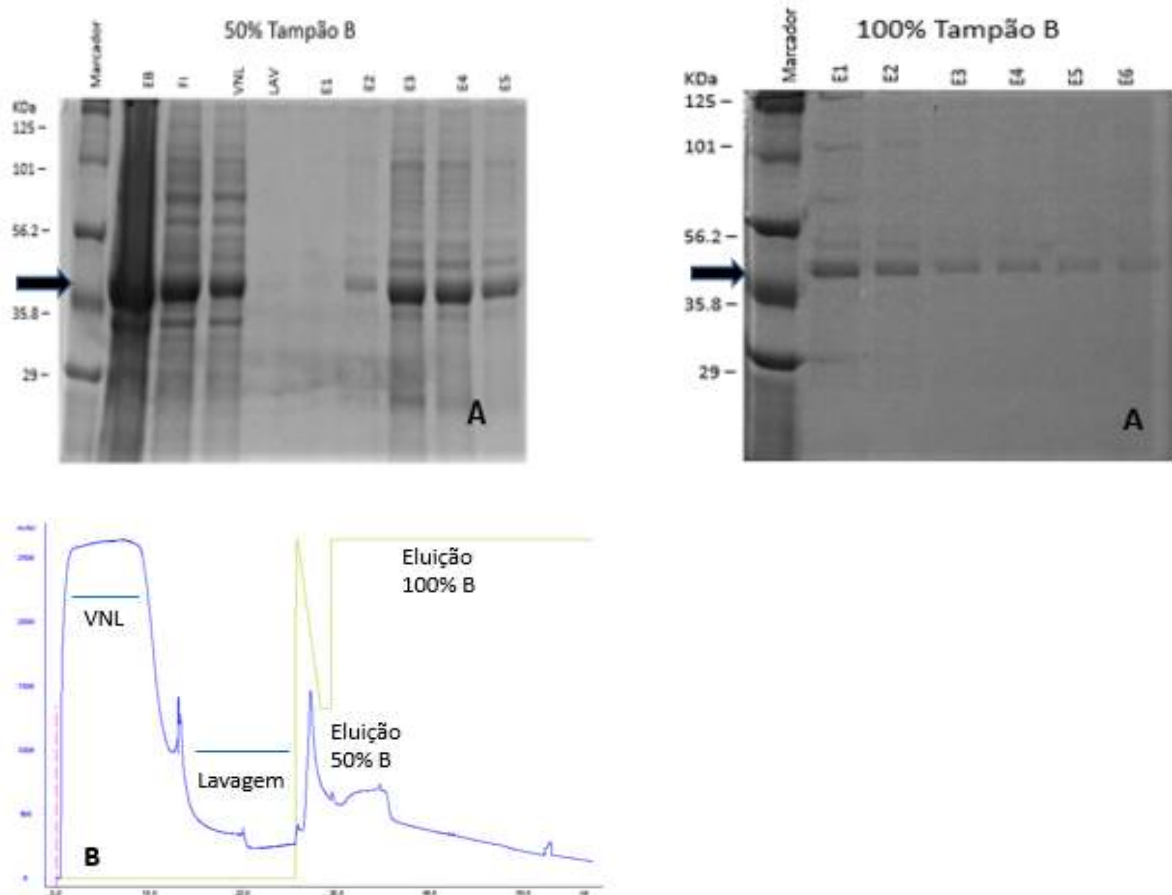
No Protocolo P3 (descrita no item 4.4.3), realizado a partir com solubilizado obtido pelo protocolo de congelamento e descongelamento. O purificado recuperado quantificado por Bradford apresentou uma concentração de 1,489mg/mL, e uma alta pureza devido a abundancia da banda da rLicNTPDase2-Gold em relação às outras bandas, porém a presença de muitas outras bandas não desejadas demonstra uma baixa pureza qualitativa (figura 19), pode ser observado uma redução da perda de proteína de interesse no VNL e ausência na etapa de lavagem, podendo ser justificada pela alteração na concentração do Imidazol (5mM) do tampão de lavagem. O imidazol tem afinidade pelo níquel presente na coluna de cromatografia, essa molaridade de imidazol permitiu que a proteína de interesse se ligasse a coluna com maior afinidade, porém também favoreceu a ligação de outras proteínas que apresentam atração pelo níquel. Em análise da cromatografia figura 19B é possível verificar um pico agudo e constante que define um perfil satisfatório de eluição, onde a alteração na concentração de Imidazol no tampão B (250mM) foi suficiente para se ligar ao níquel da coluna e desligar a proteína alvo,

porém a utilização de 100% do tampão promoveu a eluição de outras proteínas que levaram a uma baixa pureza qualitativa, como verificado na figura 19.



**Figura 19: Análise da purificação da rLicNTPDase2-Gold do corpo de inclusão – Protocolo P3.** (A) As amostras de indução foram coletadas extrato total de lise (EB) e uma alíquota antes da injeção (FI) (protocolo L4). Durante a purificação em FPLC coletou-se o volume não ligado (VNL), a lavagem (LAV) e as eluições (E1 a E5) em 100% de tampão B. As amostras foram submetidas à técnica de SDS-PAGE em gel de poliacrilamida 10% corado com azul de coomassie, sendo aplicados 15  $\mu$ L de proteínas totais em cada canaleta, utilizando-se o padrão de massa molecular de TrueColor High Range Protein Marker (245 kDa). (B) Cromatograma da purificação de RLicNTPDase2-Gold do corpo de inclusão. Após a ingestão da amostra coletou o volume não ligado e foi feita lavagem utilizando tampão Carbonato pH 9,2 (tampão A) e eluição com 100% de tampão B: 250 mM. Fonte: Dados da pesquisa

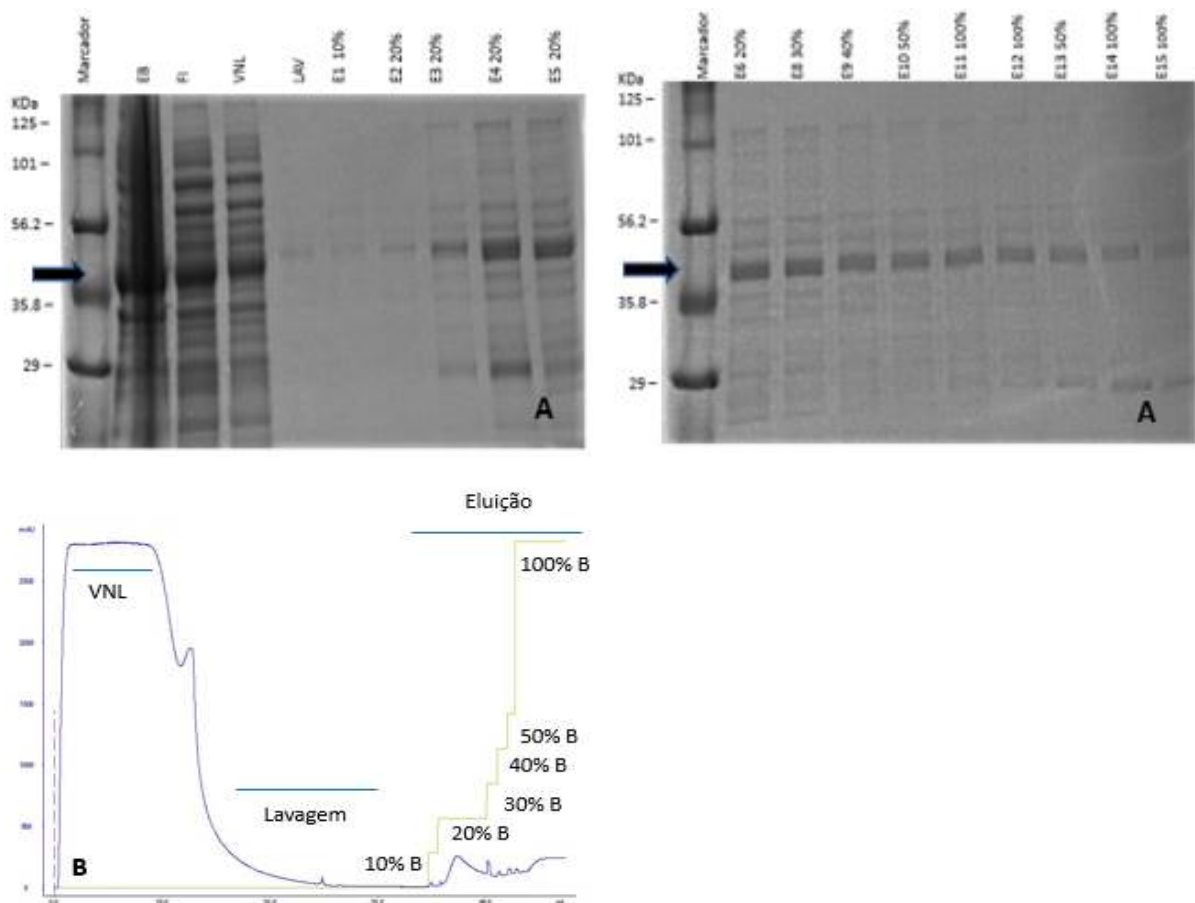
Para determinar qual porcentagem de imidazol 250mM seria eficiente para eluir e isolar a proteína de interesse das demais proteínas bacterianas que tem afinidade ao Ni (níquel) da coluna cromatográfica, os protocolos P4 e P5 (descritos no item 4.4.3), foram testados em gradientes, nas porcentagens de 50% e 100 %, e de 20%, 30%, 40%, 50% e 100% de B respectivamente. Em P4 houve uma concentração total do purificado de 1,554 mg/ (Calculado por densitometria) mL. Ao avaliar SDS-PAGE 10% observou-se maior intensidade de banda da eluição em 50% de B nas frações 3 e 4 (Figura 20a) em relação as demais bandas indicando alta pureza, já a eluição em 100% de B ocorreu prevalência da banda da proteína alvo em relação as demais indicando maior pureza qualitativa, que pode ter ocorrido devido a diluição das proteínas em 6 frações de 1mL de eluição. Também foi encontrado aumento da perda de proteína alvo no VNL, possivelmente pelo aumento da concentração de Imidazol (10mM) no tampão de lavagens que reduz a afinidade da coluna pela proteína alvo ao se ligar ao imidazol. No cromatograma (figura 20b) é possível verificar dois picos, um agudo que indica a eluição em 50% e um alargado eluição em 100% de Tampão B.



**Figura 20: Análise da purificação da rLicNTPDase2-Gold do corpo de inclusão – Protocolo P4.** (A) As amostras de indução foram coletadas extrato total de lise (EB) e uma alíquota antes da injeção (FI) (protocolo L4). Durante a purificação em FPLC coletou-se o volume não ligado (VNL), a lavagem (LAV) e os steps 50% (E1 a E5) e eluição em 100% de tampão B (E1 a E6). As amostras foram submetidas à técnica de SDS-PAGE em gel de poliacrilamida 10% corado com azul de coomassie, sendo aplicados 15  $\mu$ L de proteínas totais em cada canaleta, utilizando-se o padrão de massa molecular Class Five Prestained Multicolor Protein Ladder (125 kDa). (B) Cromatograma da purificação de rLicNTPDase2-Gold do corpo de inclusão. Após a ingestão da amostra coletou o volume não ligado e foi feita lavagem utilizando tampão Carbonato pH 9,2 (tampão A) e eluição com steps de 50% de tampão B (E1 a E5) e, por fim, a eluição com 100% de tampão B: 250 mM (E1-E6). Fonte: Dados da pesquisa

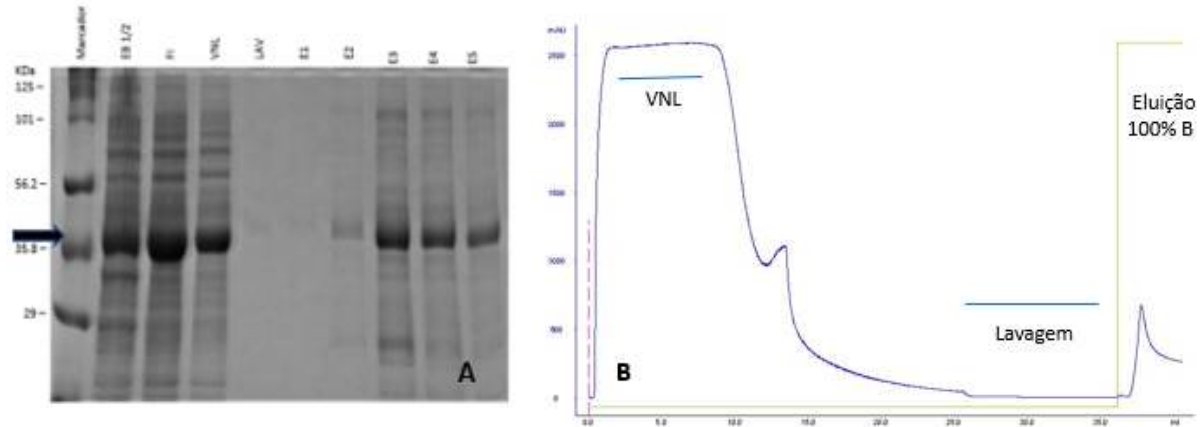
Em P5 observou-se eluição a partir de 20% do Tampão B, mantendo-se um padrão relativo na concentração de proteínas até as eluições na porcentagem de 100% desse tampão, acompanhada de um aumento na pureza qualitativa, possivelmente devido a diluição das proteínas ao longo das 15 frações de 1mL da eluição. A quantificação da proteína por densitometria apresentou um valor de 1,597 mg/mL, esse método de quantificação foi adotado para obtenção de uma concentração mais precisa da proteína, visto que o purificado não apresenta uma alta pureza qualitativa e o método de Bradford realiza a quantificação das proteínas de uma amostra incluindo as que não são interesse, já a densitometria permite avaliar as frações de forma individualizada, determinando a concentração da proteína alvo (MCPHERSON, 2011).

Assim como em P4 houve aumento da perda de proteína alvo no VNL, confirmando a hipótese do aumento da concentração de Imidazol (10mM) no tampão de lavagens como causa da redução da afinidade da rLicNTPDase2-Gold e de outras proteínas da amostra ao Ni da coluna de purificação, que favoreceu uma melhora na pureza qualitativa ao ser comparado com P3. E no cromatograma é possível verificar vários pequenos picos agudos que define as eluições nas diferentes concentrações de Tampão B (figura 21) porém a metodologia de steps não trouxe melhorias significativa ao processo de purificação no que se refere a obtenção de uma alta pureza qualitativa, visto que houve diluição das amostras nas diversas frações de eluição sem ocorrer alta redução das outras proteínas bacterianas que não são de interesse.

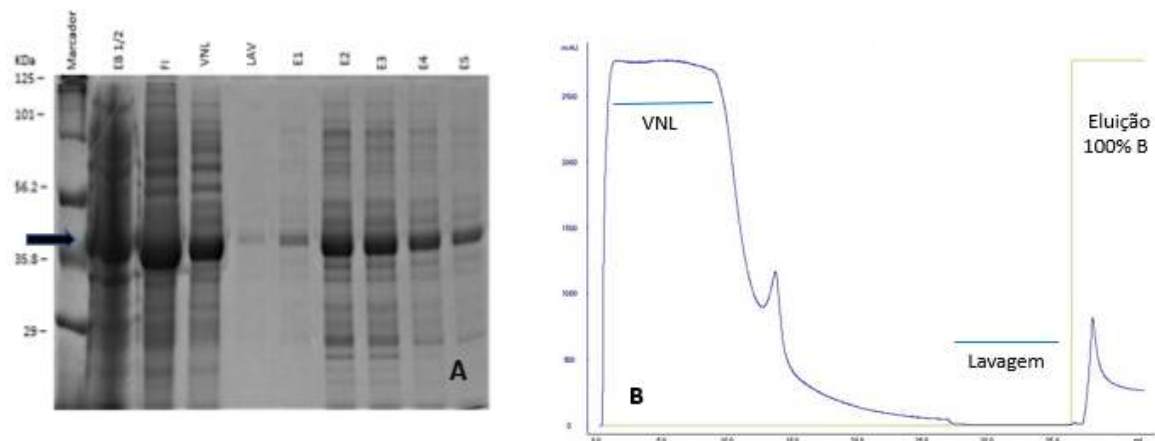


**Figura 21: Análise da purificação da rLicNTPDase2-Gold do corpo de inclusão – Protocolo P5.** (A) As amostras de indução foram coletadas extrato total de lise (EB) e uma alíquota antes da injeção (FI) (protocolo L4). Durante a purificação em FPLC coletou-se o volume não ligado (VNL), a lavagem (LAV) e os steps 10% (E1), 20% (E2 a E6), 30% (E8), 40% (E9), 50% (E10) e eluição em 100% de tampão B (E11 a E 15). As amostras foram submetidas à técnica de SDS-PAGE em gel de poliacrilamida 10% corado com azul de coomassie, sendo aplicados 15  $\mu$ L de proteínas totais em cada canaleta, utilizando-se o padrão de massa molecular Class Five Prestained Multicolor Protein Ladder (125 kDa). (B) Cromatograma da purificação de RLicNTPDase2-Gold do corpo de inclusão. Após a ingestão da amostra coletou o volume não ligado e foi feita lavagem utilizando tampão Carbonato pH 9,2 (tampão A) e eluição com steps de 10% a 100% de tampão B: 250 mM (E1-E6). Fonte: Dados da pesquisa

Os protocolos P6 e P7 descritos no item 4.4.3, realizados com o propósito de aumentar a pureza qualitativa do purificado a partir da alteração no protocolo de lise, não apresentaram resultados significativos ao esperado, ambas purificações seguiram o mesmo padrão determinado a partir da avaliação dos protocolos anteriormente testados. A amostra foi injetada a uma taxa de 0,5 mL/min, uma velocidade que permite melhor interação da proteína ao níquel da coluna HisTrap FF crude. Foram utilizados os tampões A (Tampão carbonato 0,05M, Uréia 1M e Imidazol 10 mM, pH 9,2) e B (Tampão carbonato 0,05M, Uréia 1 M e Imidazol 250 mM, pH 9,2) e a eluição ocorreu com 100% do tampão B. A concentração de Imidazol do tampão A permitiu a remoção da maioria das proteínas que não são de interesse e a do tampão B junto a sua porcentagem de aplicação permite uma eficiente eluição sem promover diluição da amostra, porém nenhum dos dois protocolos testados apresentaram um grande aumento da pureza qualitativa do purificado. Em análise por SDS-PAGE 10% (figura 22) em P6 é possível verificar nas canaletas referente as frações de eluição uma redução nos contaminantes, que pode ser justificado pelo protocolo de lise (L5) utilizado que promoveu redução de proteínas indesejadas sem a redução do solubilizado. E uma pureza quantitativa caracterizada pela prevalência da banda da proteína alvo em relação às demais bandas e uma quantificação por densitometria 1,3707 mg/mL. Em P7 foi mantido o padrão de pureza quantitativa apresentada em outros protocolos de purificação com prevalência da banda da proteína alvo em relação às demais bandas (figura 23) com concentração de 1,643 mg/mL (Calculado por densitometria), apesar da lise utilizada nesse protocolo (L6) promover aparentemente maior redução de proteínas indesejadas em relação a lise L5 a purificação P7 não apresentou melhor pureza qualitativa que P6. Em análise da cromatografia por monitoramento da absorbância em 280 nm, pode-se observar a partir do início da eluição um pequeno pico agudo e constante, tanto em P6 quanto em P7, o qual corresponde a eluições da rLicNTPDase2-Gold (Figuras 22B e 23B respectivamente).



**Figura 22: Análise da purificação da rLicNTPDase2-Gold do corpo de inclusão – Protocolo P6.** (A) As amostras de indução foram coletadas extrato total de lise (EB) diluição  $\frac{1}{2}$  e uma alíquota antes da injeção (FI) (protocolo L5). Durante a purificação em FPLC coletou-se o volume não ligado (VNL), a lavagem (LAV) e as eluições (E1 a E5) em 100% de tampão B. As amostras foram submetidas à técnica de SDS-PAGE em gel de poliácridamida 10% corado com azul de coomassie, sendo aplicados 15  $\mu$ L de proteínas totais em cada canaleta, utilizando-se o padrão de massa molecular Class Five Prestained Multicolor Protein Ladder (125 kDa). (B) Cromatograma da purificação de rLicNTPDase2-Gold do corpo de inclusão. Após a ingestão da amostra coletou o volume não ligado e foi feita lavagem utilizando tampão Carbonato pH 9,2 (tampão A) e eluição com 100% de tampão B: 250 mM. Fonte: Dados da pesquisa



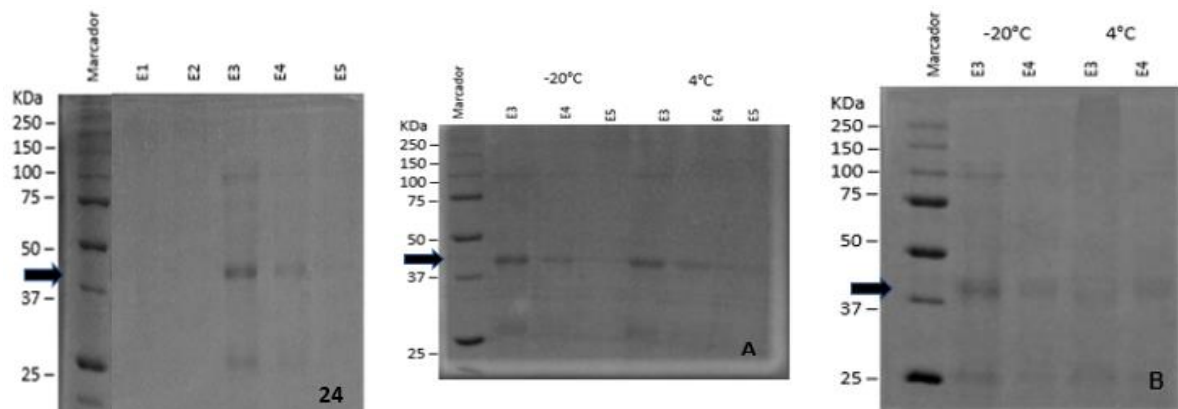
**Figura 23: Análise da purificação da rLicNTPDase2-Gold do corpo de inclusão – Protocolo P7.** (A) As amostras de indução foram coletadas extrato total de lise (EB) diluição  $\frac{1}{2}$  e uma alíquota antes da injeção (FI) (protocolo L6). Durante a purificação em FPLC coletou-se o volume não ligado (VNL), a lavagem (LAV) e as eluições (E1 a E5) em 100% de tampão B. As amostras foram submetidas à técnica de SDS-PAGE em gel de poliácridamida 10% corado com azul de coomassie, sendo aplicados 15  $\mu$ L de proteínas totais em cada canaleta, utilizando-se o padrão de massa molecular Class Five Prestained Multicolor Protein Ladder (125 kDa). (B) Cromatograma da purificação de rLicNTPDase2-Gold do corpo de inclusão. Após a ingestão da amostra coletou o volume não ligado e foi feita lavagem utilizando tampão Carbonato pH 9,2 (tampão A) e eluição com 100% de tampão B: 250 mM. Fonte: Dados da pesquisa

Dentre os protocolos de purificação por cromatografia de afinidade em FPLC utilizando a coluna HisTrap FF cruda testados, o protocolo P6 resultou na purificação de uma proteína com a melhor pureza qualitativa e uma concentração superior a mínima necessária para desenvolvimento de tiras ILFA (0,5mg/mL), sendo esse protocolo determinado como padrão para purificações posteriores.

#### 5. 4 Teste de Estabilidade da Proteína pós Purificação

A estabilidade da proteína recombinante purificada foi avaliada em relação ao tempo e temperatura de armazenamento, visto que as condições de eluição e lavagem e ação de ácidos e ureia utilizados no processo podem comprometer a estabilidade da proteína. As proteínas insolúveis nos corpos de inclusão são protegidas da degradação por proteases bacterianas, quando são solubilizadas em formulações líquidas se tornam instáveis, devido às ligações de hidrogênio entre as moléculas de água e da proteína e outras reações degradativas que ocorrem mais rapidamente em meio aquoso (NOVAIS, 2021). Assim o tempo de armazenamento e a temperatura são parâmetros importantes para avaliar a degradação de uma proteína em meio líquido. Portanto, foram realizadas análises em um período aproximado de 15 e 30 dias após purificação, armazenadas nas temperaturas de 4°C e - 20°C.

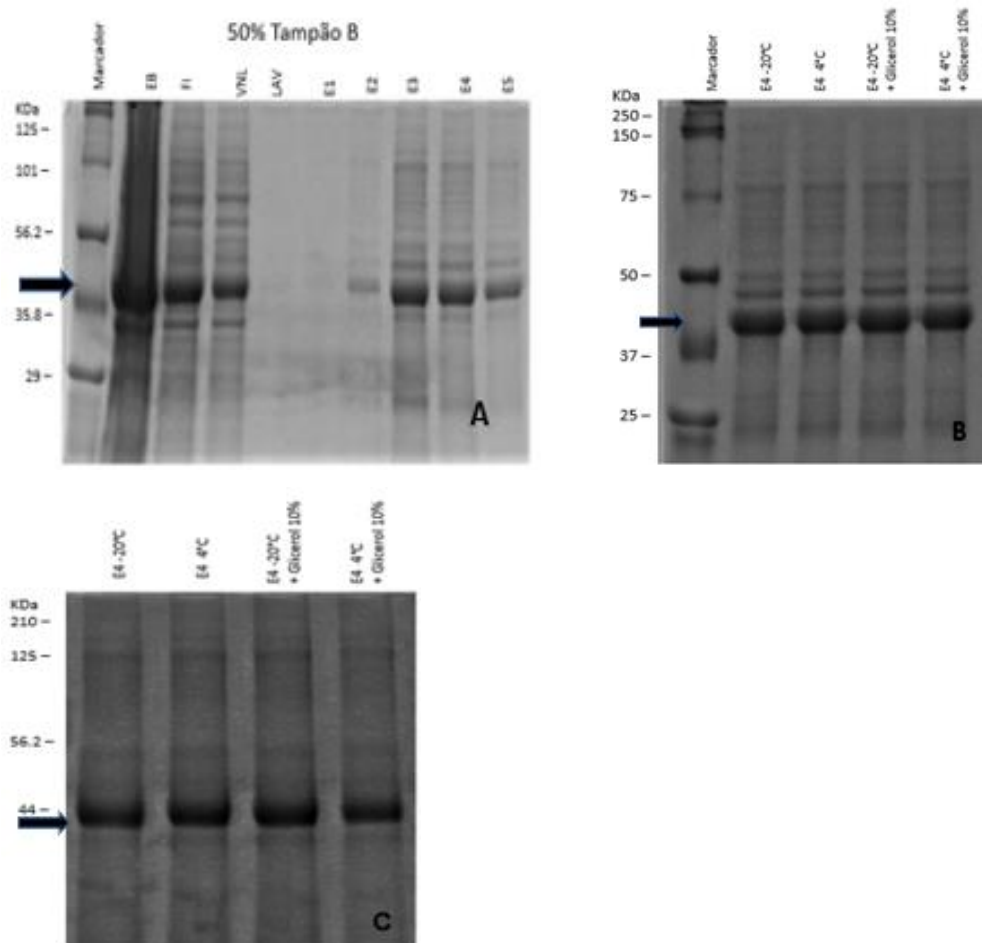
A rLicNTPDase2-Gold solubilizada e purificada com tampão carbonato 0,05M e Ureia 8M, apresentou uma degradação parcial em 15 dias e 30 dias após data de purificação, tanto a 4°C quanto a -20°C, como pode ser observada na figura 24



**Figura 24: Análise da estabilidade da rLicNTPDase2-Gold – Protocolo de P1.** Análise SDS-PAGE em gel de poliacrilamida 10% corado com azul de coomassie, sendo aplicados 15 µL de proteínas totais em cada canaleta, utilizando-se o padrão de massa molecular de 250 kDa (Bio-Rad). (24) Para análise de estabilidade considerou-se as eluições E3, E4 e E5. (A) Proteínas purificadas mantidas em diferentes condições de temperatura após aproximadamente 15 dias. (B) após aproximadamente 30 dias. Fonte: Dados da pesquisa

A redução na concentração de ureia no tampão de solubilização e purificação, utilizando o tampão carbonato 0,05M e Ureia 1M, resultou em melhores condições de estabilidade da proteína, reduzindo a degradação tanto a 4°C quanto a -20°C. É possível verificar visualmente em 15 dias após purificação não houve degradação significativa da proteína alvo e após 30 dias houve uma redução aproximada de 50% na concentração, avaliada por SDS-PAGE 10% e por cálculo densitometria como observado respectivamente na figura 25 e tabela 3, A amostra utilizada para o teste de estabilidade foi referente a fração de eluição E4 devido sua pureza e

concentração (0,652 mg/mL). A adição de glicerol 10% foi outro parâmetro avaliado, com a finalidade de melhorar a estabilidade da proteína, porém a adição do estabilizante não surtiu alterações de aumento da estabilidade, as amostras sem estabilizante apresentaram o mesmo comportamento das amostras com glicerol 10% armazenadas a 4°C e -20°C.



**Figura 25: Análise da estabilidade da rLicNTPDase2-Gold – Protocolo de P4.** Análise SDS-PAGE em gel de poliacrilamida 10% corado com azul de coomassie, sendo aplicados 15  $\mu$ L de proteínas totais em cada canaleta, (A) Proteínas purificadas, para análise da estabilidade considerou-se a eluições E4. Como marcador o padrão de massa molecular Class Five Prestained Multicolor Protein Ladder (125 kDa). (B) Proteínas purificadas mantidas em diferentes condições de temperatura e com presença e ausência de estabilizantes, após aproximadamente 15 dias da data de purificação. Como marcador foi utilizando o padrão de massa molecular de 250 kDa (Bio-Rad). (C) após aproximadamente 30 dias. Como marcador o padrão de massa molecular Sigma, 10 -20% tris-Tricini, Sigma (210 kDa). Fonte: Dados da pesquisa

Data	-20°C	4°C	-20°C + Glicerol 10%	4°C + Glicerol 10%
23/03/2023	0,652mg/mL	0,652mg/mL	0,652mg/mL	0,652mg/mL
11/04/2023	0,650mg/mL	0,543mg/mL	0,582mg/mL	0,482mg/mL
01/05/2023	0,356mg/mL	0,2919mg/mL	0,300mg/mL	0,300mg/mL

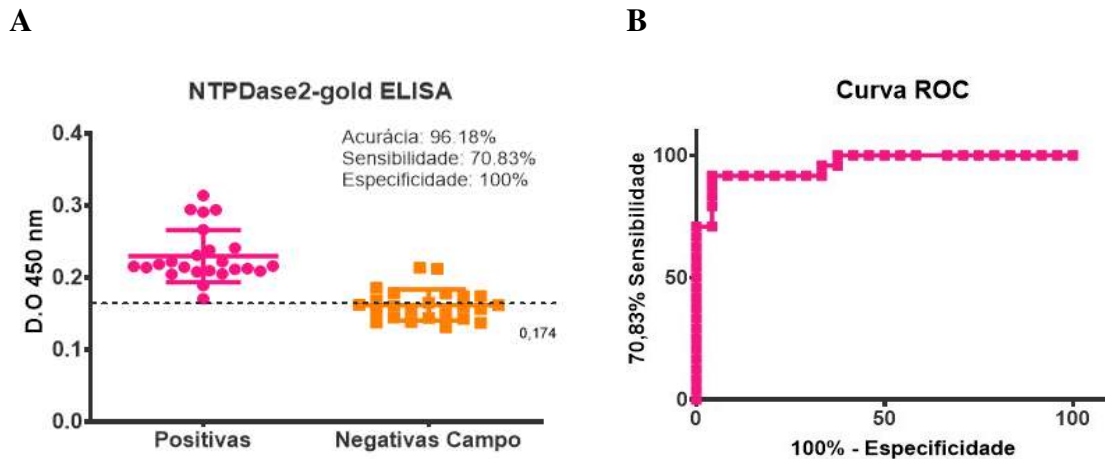
**Tabela 3: Teste de estabilidade proteínas purificadas (Eluição E4):** As proteínas foram mantidas em diferentes condições de temperatura, com presença e ausência de estabilizantes, sendo analisadas aproximadamente 15 e 30 dias após data de purificação. Fonte: Dados da pesquisa

Como nas condições de temperatura  $-20^{\circ}\text{C}$  e  $4^{\circ}\text{C}$  a proteína rLicNTPDase2-Gold manteve o mesmo padrão de estabilidade. O armazenamento a  $4^{\circ}\text{C}$  possibilita a utilização dos testes por Imunocromatografia em trabalho fora do ambiente laboratorial, desde que mantidos em caixa térmica com monitoramento da temperatura por termômetro digital. Assim torna-se possível a aplicação da proteína se necessário usar em temperatura de  $4^{\circ}\text{C}$  em teste para triagem diagnóstica LVC em campo.

### 5.5 Resultado ELISA

Resultados anteriores publicados pelo grupo de pesquisa evidenciam o potencial da proteína recombinante rLicNTPDase-2 no diagnóstico imunológico da LVC, em estudos de Fase I, em uma amostragem menor que 100, contendo amostras LVC positivas, amostras negativas e amostras de cães infectados com *T. cruzi*, foram observadas alta sensibilidade e especificidade com valores respectivos de 100% (IC 95% = 92,60-100,0%) e 100% (IC 95% = 86,77-100,0%) De Souza et. al (2012). Estudo de Fase II utilizando 651 amostras, apresentou alta sensibilidade (92,6%) e alta especificidade (88,5%) (de SOUZA et. al. 2020).

Como foi adicionado um peptídeo a rLicNTPDase-2 para construção da proteína rLicNTPDase2-Gold, a fim de aumentar sua afinidade ao ouro coloidal e aplicação no desenvolvimento do teste rápido, um ensaio de verificação da funcionalidade dessa proteína foi realizado por ELISA (como descrito no item 4.8), utilizando 24 amostras positivas e 24 amostras negativas para LVC. Os resultados apresentados na figura 26, foram satisfatórios para confirmar a funcionalidade da proteína rLicNTPDase2-Gold, apresentando acurácia de 96,18%, sensibilidade de 70,83 % e especificidade de 100%, confirmando a interação do antígeno com os anticorpos presentes nas amostras, viabilizando sua utilização para ensaios imunológicos. Para a definição do melhor cut-off para este método, escolheu-se aquele em que se obteve o maior valor de somatório do par ordenado (sensibilidade x especificidade) e este foi correspondente a um coeficiente de 0,1705. Uma das possíveis justificativas para a menor sensibilidade encontrada aqui pode ser a utilização de um pequeno número de amostras. Uma boa sensibilidade garante a detecção de casos positivos e alta especificidade permite um diagnóstico diferencial, sendo esses resultados promissores para utilização da rLicNTPDase2-Gold como antígeno em imunoenensaio cromatográfico rápido de fluxo lateral ao conferir resultados confiáveis ao diagnóstico da LVC.



**Figura 26: Avaliação da funcionalidade da rLicNTPDase2-Gold pelo método ELISA.** (A) gráfico mostrando a performance de reconhecimento antigo-anticorpo usando-se amostras positivas e negativas para LVC. Antígeno obtido por pré-purificação e soro positivo e negativo (1:80). (B) curva ROC da performance de reconhecimento antigo-anticorpo usando-se amostras positivas e negativas para LVC. Curva ROC da interação Antígeno- IgG analisando a sensibilidade e especificidade dessa interação. Fonte: Dados da pesquisa

## 5.6 Resultado Teste Adsorção ao Ouro

O conjugado foi preparado a partir da adsorção da proteína rLicNTPDase2-Gold e ouro coloidal 40nm, a estabilidade da ligação ocorre por meio da adsorção espontânea, onde a superfície das partículas de ouro (carga negativa) fixa a proteína por meio de interações eletrostáticas, hidrofóbicas e de Van der Waals (CYTODIAGNOSTICS Inc., 2023)

Para otimização da adsorção da proteína ao ouro coloidal algumas características foram consideradas como o ponto isoelétrico da proteína (pI), o pH da reação, a concentração da proteína, a concentração de sais e o tamanho da partícula de ouro coloidal. Em relação a última característica, partículas com mais de 40 nm diminuem a estabilidade de ligação do ouro coloidal e partículas maiores aumentam a sensibilidade no teste rápido, por tanto, para o presente teste foi utilizado o ouro coloidal 40 nm que baseado na literatura promoverá conjugados estáveis e permitirá boa sensibilidade ao teste rápido (JAPOLLA et. al, 2015).

A concentração de proteína deve ser suficiente para promover adsorção ao ouro coloidal de forma estável prevenindo a agregação induzida por NaCl 10%, uma adição excessiva de proteínas produz conjugados de maior atividade específica, no entanto, essa sobrecarga pode causar proteínas fracamente ligadas, levando a instabilidade do conjugado. Para otimização da concentração de proteínas, diferentes quantidades da proteína purificada (de 0 a 4,2 µg) foram adicionados à solução de ouro coloidal 40nm, sendo incubadas por 30 min. Decorrido o tempo, 20 µL da solução de NaCl a 10% foi adicionada à mistura, e a concentração mínima de proteína que manteve a cor vermelha sem alteração foi considerada a ideal. A adsorção foi confirmada

por espectro de absorção UV-visível (400–900 nm). Quando o pico máximo de absorção apresenta um deslocamento em relação a absorbância do ouro coloidal puro indica que ocorreu a conjugação (TANG, 2022).

A presença de sais na solução coloidal ou no tampão de corrida do teste rápido pode interferir na estabilidade do conjugado. As partículas de ouro coloidal apresentam carga negativa que geram uma repulsão criando uma barreira energética, para ocorrer a ligação entre ouro e a molécula de proteínas essa barreira deve ser superada atingindo a região de atração van der waals, a adição de eletrólitos na solução pode mascarar a carga negativa em cada partícula, e os efeitos de repulsão negativa, então a adsorção irá ocorrer com as moléculas de proteína em vez de com outras partículas de ouro, porém, altas concentração de eletrólitos leva as partículas de ouro adsorverem umas às outras formando grandes agregados (CYTODIAGNOSTICS Inc., 2023; HERMANSON, 2007)

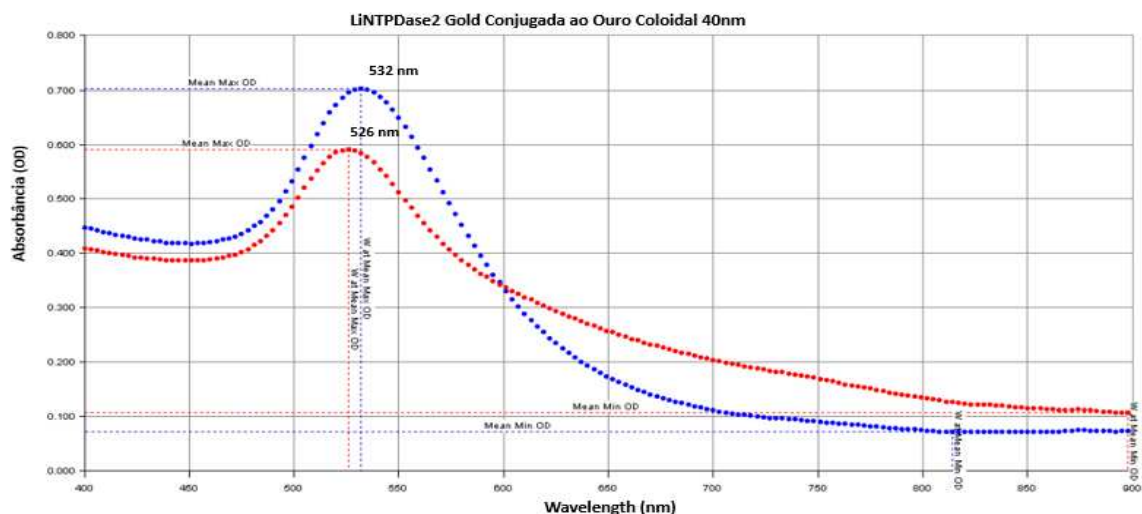
A adição de eletrólitos como NaCl na suspensão coloidal ou em sais de tampão, contribui para adsorção entre ouro coloidal e proteínas e permite avaliar a estabilidade do conjugado, uma vez que se não houver moléculas de proteínas ou estas se encontrarem em baixas concentrações na reação, a adição de NaCl causaria a coagulação das partículas de ouro. E a agregação seria acompanhada por uma mudança de cor da solução de vermelho-alaranjado para vermelho-violeta ou azul. Baseado nessas informações para o presente teste de estabilidade da adsorção entre ouro coloidal 40nm e rLicNTPDase2-Gold, foram adicionados 20 µL de NaCl 10% na suspensão coloidal, analisando o resultado por meio da observação visual da coloração vermelha ou azul/roxa, e análise por espectro de absorção UV-visível (absorbância 400–900 nm) (TANG, 2022; CYTODIAGNOSTICS Inc., 2023).

A figura 27 apresenta o resultado do teste de determinação da melhor concentração da rLicNTPDase2-Gold que permite a adsorção ao ouro coloidal 40 nm e garante a estabilidade do conjugado mediante adição de NaCl 10%. O Primeiro poço apresenta ouro coloidal puro e é usado como parâmetro de comparação para análise visual e espectro de absorbância. Com adição dos sais a esse poço houve agregação entre as partículas de ouro coloidal formando um precipitado e a alteração da cor da solução de vermelha para azul/roxa, em análise do espectrofotômetro (absorbância 400–900 nm) é observado um alargamento do pico de absorção e uma diminuição das intensidades do pico (figura 28) ao ser comparado com a suspensão coloidal que apresenta a concentração mínima de proteínas que gera estabilidade de adsorção (0,53µg).

Os demais poços apresentam variadas concentrações de proteínas, sendo que a estabilidade da ligação observada pela presença da cor vermelha sem formação de precipitados inicia-se na concentração de 53 $\mu$ g (Figura 27). A adsorção foi confirmada por espectro de absorção UV-visível (400–900 nm), onde o pico máximo de absorção apresenta um deslocamento em relação a absorbância do ouro coloidal puro (figura 28). A concentração de 0,53 $\mu$ g foi determinada como ideal para preparo do conjugado, uma vez que apresenta a concentração mínima de proteínas a gerar estabilidade na ligação ao ouro coloidal e o aumento na concentração de proteína poderia gerar uma sobrecarga levando a proteínas fracamente ligadas e a instabilidade do conjugado (TANG, 2022; CYTODIAGNOSTICS Inc., 2023).



**Figura 27: Análise visual para determinação da concentração ideal da proteína rLicNTPDase2-Gold para otimização da sua adsorção ao ouro coloidal 40nm.** Foram adicionados a cada poço contendo 200  $\mu$ L de ouro coloidal, os volumes de proteína correspondente a concentração de 0 $\mu$ g a 4,24 $\mu$ g (da esquerda para a direita). A estabilidade da ligação é observada pela presença da cor vermelha sem formação de precipitados. Fonte: Dados da pesquisa



**Figura 28: Análise da adsorção rLicNTPDase2-Gold e Ouro coloidal 40nm, por espectro de absorção UV-visível.** O pico máximo de absorção da suspensão do conjugado (200 $\mu$ l de ouro coloidal e 0,53 $\mu$ g de proteína) 526 nm (representado em azul) apresenta um deslocamento em relação a absorbância do ouro coloidal puro 532nm (representado em vermelho), indicando que ocorreu a conjugação de forma estável (absorbância 400–900 nm). Fonte: Dados da pesquisa

A estabilidade do conjugado, depende de características como o ponto isoelétrico da proteína (pI) e o pH da reação de adsorção, geralmente a adsorção eficiente ocorre em pH próximo do ponto isoelétrico da proteína, por ser um pH de neutralidade elétrica líquida, em que quaisquer forças repulsivas ou atrativas induzidas eletricamente são equilibradas, assim, quando o valor do pH é menor do que o ponto isoelétrico (pI) da proteína a adição de proteínas ao ouro coloidal pode resultar em uma rápida agregação das partículas de ouro. Já o aumento do pH acima do pI da proteína, gera diminuição de proteína adsorvida devido ao aumento de cargas negativas presentes na proteína (HERMANSON, 2007).

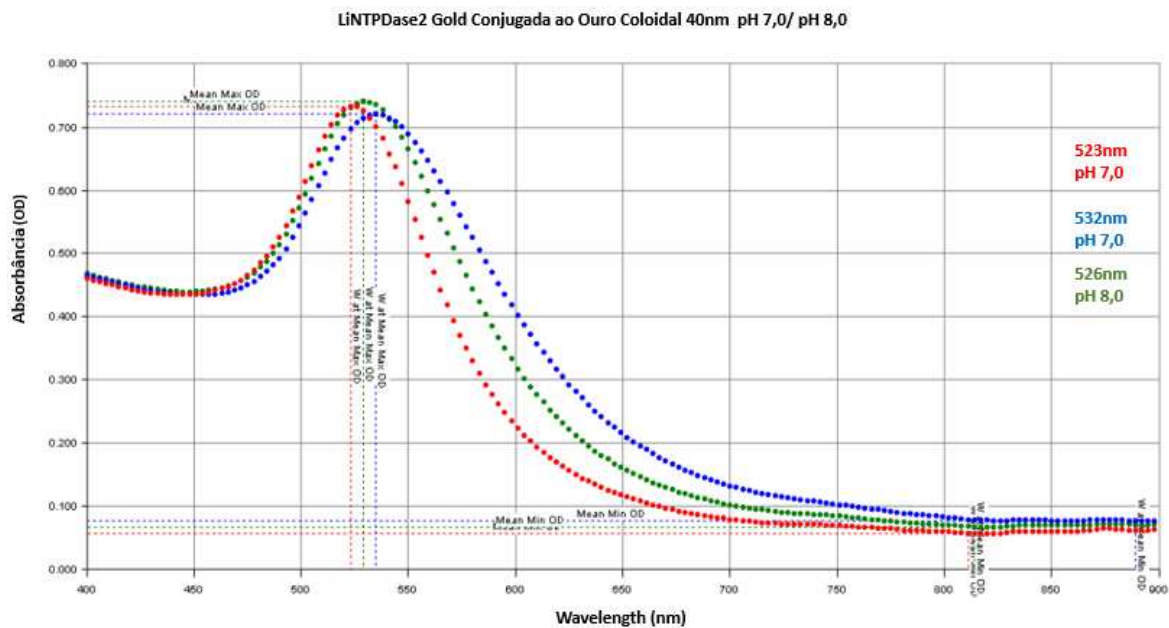
O pH da solução de mistura ouro coloidal e proteína foi ajustada com carbonato de potássio ( $K_2CO_3$  0,1 M), afim de avaliar alterações nas condições de adsorção mediante alteração do pH, como descrito no item 4.10.1. Para isso, foi escolhida a concentração mínima de proteína que manteve a cor vermelha e confirmação de adsorção por análise em espectrofotômetro, visto que altas concentrações da proteína podem levar a formação de conjugados instáveis. Volumes variados (0-10  $\mu$ L) de  $K_2CO_3$  0,1 M foram adicionados ao conjugado e incubado por 30 min e posteriormente revelada com 20  $\mu$ L da solução de NaCl a 10%. Assim o pH ótimo foi definido como o correspondente volume de  $K_2CO_3$  (0,1M) que manteve a cor da solução vermelha, sem alteração (vermelha para azul/roxa), o que indica conjugação sem formação de agregados. O resultado visual foi confirmado por espectro de absorção UV-visível (400–900 nm). Quando ocorre formação de agregados indica que a ligação não está totalmente estável na condição testada, assim ocorre alargamento dos picos de absorção e uma diminuição das intensidades do pico.

A figura 29 apresenta o resultado visual do teste que avalia alterações nas condições de adsorção entre rLicNTPDase2-Gold e ouro coloidal mediante alteração do pH. No primeiro poço foi adicionado ouro coloidal puro, nos demais poços foi adicionado 0,53 $\mu$ g da proteína e a partir do terceiro poço ocorreu ajuste do pH com adição de diferentes volumes de  $K_2CO_3$  0,1M (1-10 $\mu$ L) e variação do pH de 8,0 ao 11,0. Em análise visual é possível perceber a formação do conjugado pela permanência da cor vermelha a partir do pH 8,0, porém na análise espectro de absorção UV-visível (400–900 nm) é possível observar (Figuras 30 ao 33) uma redução na estabilidade da ligação com o aumento do pH, devido a formação de picos alargados ou redução na intensidade dos picos, isso pode ser explicado, pois o aumento do pH acima do pI da proteína (7,63), gera diminuição de proteína adsorvida devido ao aumento de cargas negativas presentes na proteína que repelem ao ouro coloidal que também apresenta carga negativa (HERMANSON, 2007; CYTODIAGNOSTICS Inc., 2023). No pH 7,0 é possível verificar

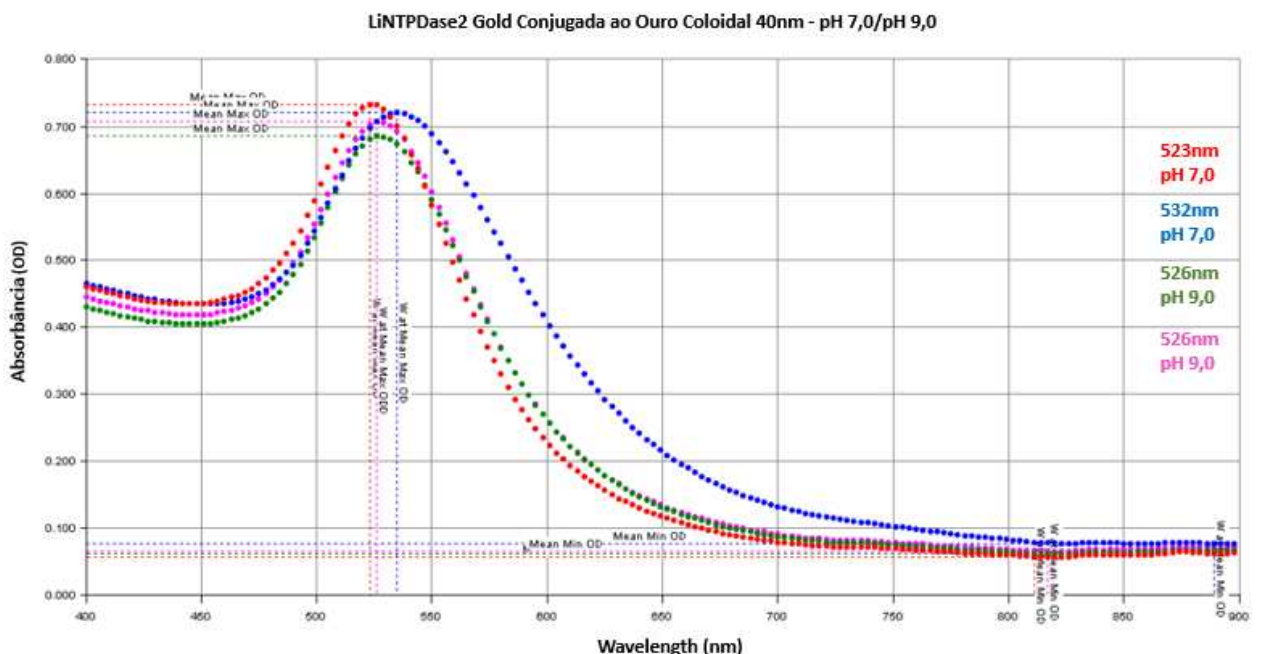
ocorrência de agregados devido a cor azul/roxa da suspensão coloidal (figura 29) e em análise do espectro de absorbância (figura 30) é possível verificar a redução na intensidade e alargamento do pico, como o pI da proteína é 7,63 e a aferição do pH foi realizada por fitas que não apresenta um valor preciso, a agregação pode ser explicada, quando o valor do pH é menor do que o ponto isoelétrico (pI) da proteína a adição de proteínas ao ouro coloidal pode resultar em uma rápida agregação das partículas de ouro por não ocorrer adsorção entre essas e as proteínas que sofreram modificações conformacionais devido ao pH ácido da suspensão coloidal (HERMANSON, 2007; CYTODIAGNOSTICS Inc., 2023). O pH 8,0 apresentou maior estabilidade de adsorção tanto por análise visual mantendo a cor vermelha sem a formação de precipitados (figura 29) quanto análise por espectrofotômetro (figura 30) que indica um deslocamento no pico máximo de absorção em relação a absorbância do ouro coloidal puro. Isso ocorreu, pois, a solução coloidal encontra-se em pH de neutralidade elétrica líquida (valor próximo do ponto isoelétrico da proteína), em que quaisquer forças repulsivas ou atrativas induzidas eletricamente são equilibradas (HERMANSON, 2007; CYTODIAGNOSTICS Inc., 2023).



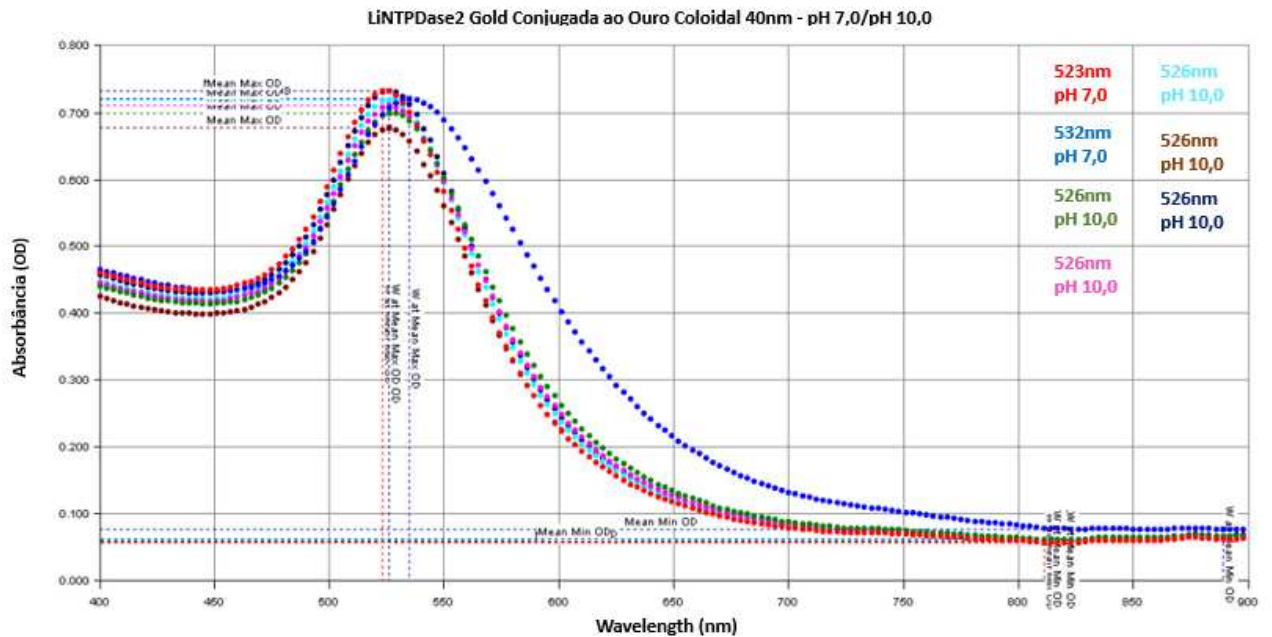
**Figura 29: Avaliação visual das condições de adsorção mediante alteração do pH.** Para verificar a interferência do pH ao processo de adsorção, volumes variados (0-10  $\mu$ L) de  $K_2CO_3$  0,1 M foram adicionados ao conjugado. O pH ótimo foi definido como o correspondente volume de  $K_2CO_3$  (0,1M) que manteve a cor da solução vermelha, sem alteração (vermelha para azul/roxa), o que indica conjugação sem formação de agregados. Fonte: Dados da pesquisa



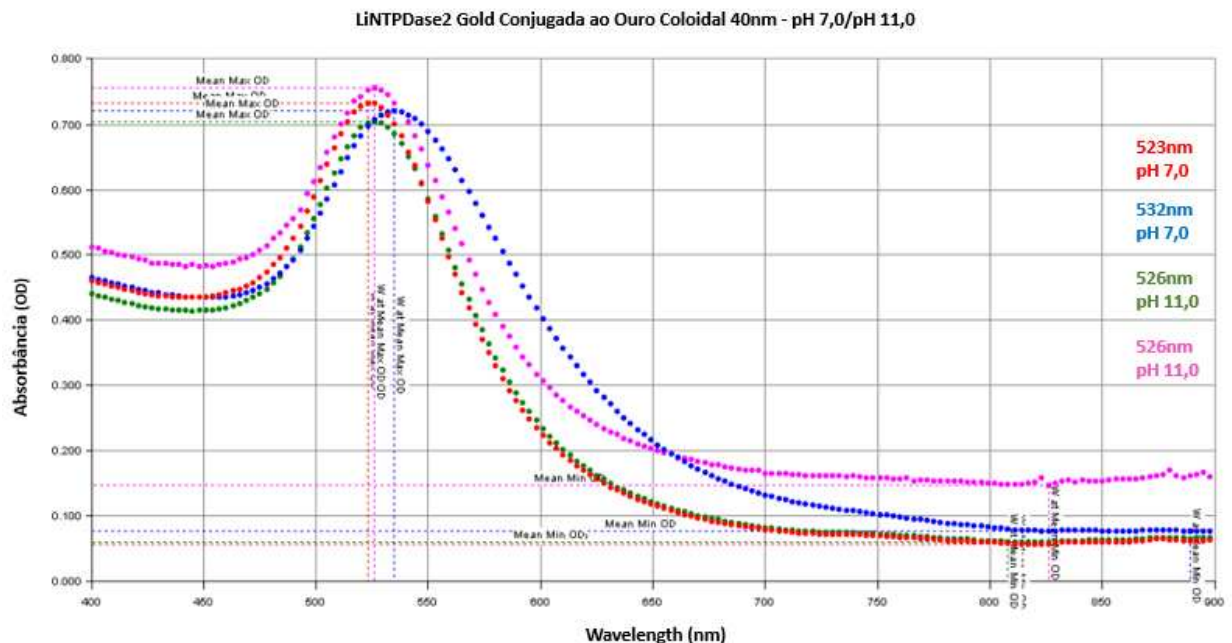
**Figura 30** Análise da adsorção por espectro de absorção UV-visível da rLicNTPDase2-Gold e Ouro coloidal 40nm em pH 7,0 e 8,0. A solução de ouro coloidal puro sem adição de NaCl (representado em vermelho) apresenta um pico máximo em 523nm, o conjugado em pH 7,0 apresenta uma redução na estabilidade da ligação pela formação de pico alargado (532 nm) e com menor intensidade do pico (representado em azul). Em pH 8,0 O pico máximo de absorção da suspensão do conjugado 526 nm (representado em verde) apresenta um deslocamento em relação a absorbância do ouro coloidal puro 523nm (representado em vermelho), indicando que ocorreu a conjugação de forma estável. Fonte: Dados da pesquisa



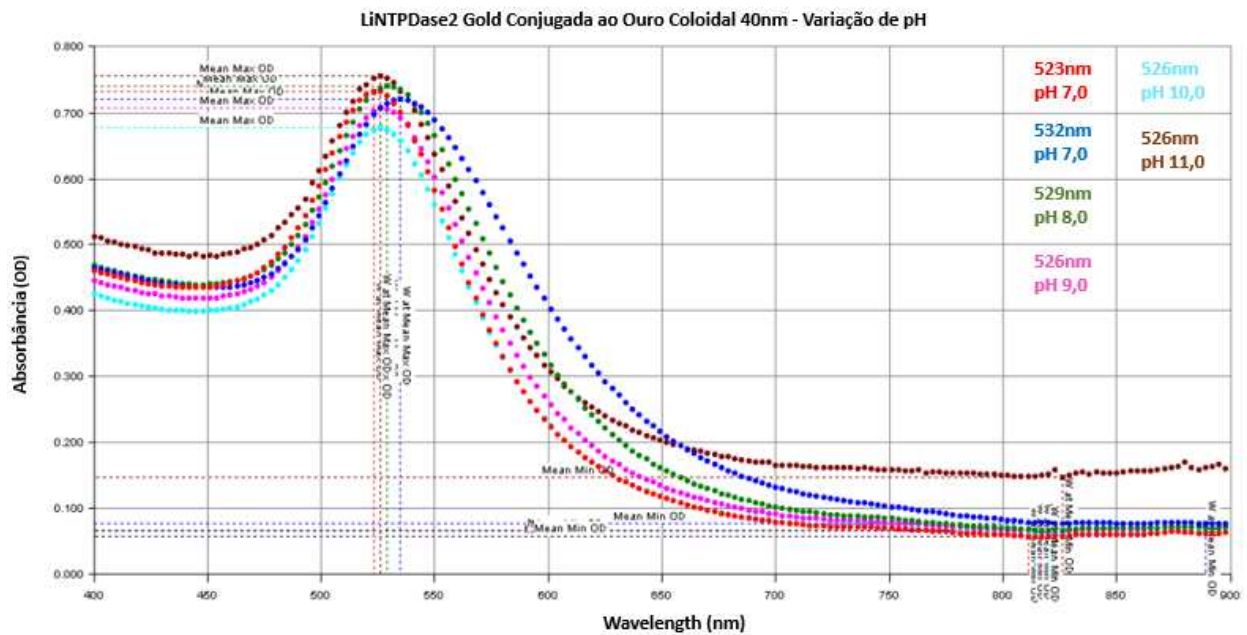
**Figura 31** Análise da adsorção por espectro de absorção UV-visível da rLicNTPDase2-Gold e Ouro coloidal 40nm em pH 7,0 e 9,0. A solução de ouro coloidal puro sem adição de NaCl (representado em vermelho) apresenta um pico máximo 523nm, o conjugado em pH 7,0 apresenta uma redução na estabilidade da ligação pela formação de picos alargados (532 nm) e com menor intensidade do pico (representado em azul). Em pH 9,0 houve redução da estabilidade de ligação com formação de picos com menor intensidade 526 nm (representado em verde e rosa). Fonte: Dados da pesquisa



**Figura 32:** Análise da adsorção por espectro de absorção UV-visível da rLicNTPDase2-Gold e Ouro coloidal 40nm em pH 7,0 e 10,0. A solução de ouro coloidal puro sem adição de NaCl (representado em vermelho) apresenta um pico máximo 523nm, o conjugado em pH 7,0 apresenta uma redução na estabilidade da ligação pela formação de picos alargados (532 nm) e com menor intensidade do pico (representado em azul). Em pH 10,0 houve redução da estabilidade de ligação com formação de picos com menor intensidade 526nm (representado em verde, rosa, verde água, marrom e azul escuro). Fonte: Dados da pesquisa



**Figura 33:** Análise da adsorção por espectro de absorção UV-visível da rLicNTPDase2-Gold e Ouro coloidal 40nm em pH 7,0 e 11,0. A solução de ouro coloidal puro sem adição de NaCl (representado em vermelho) apresenta um pico máximo 523nm, o conjugado em pH 7,0 apresenta uma redução na estabilidade da ligação pela formação de picos alargados (532 nm) e com menor intensidade do pico (representado em azul). Em pH 11,0 houve redução da estabilidade de ligação com formação de um pico com menor intensidade 526nm (representado em verde) e um pico alargado 526nm (representado em rosa). Fonte: Dados da pesquisa



**Figura 34: Análise da adsorção por espectro de absorção UV-visível da rLicNTPDase2-Gold e Ouro coloidal 40nm em pH 7,0 a 11,0.** A solução de ouro coloidal puro sem adição de NaCl (representado em vermelho) apresenta um pico máximo 523nm, o conjugado em pH 7,0 apresenta uma redução na estabilidade da ligação pela formação de picos alargados (532 nm) e com menor intensidade do pico (representado em azul). Em pH 8,0 O pico máximo de absorção da suspensão do conjugado 526 nm (representado em verde) apresenta um deslocamento em relação a absorbância do ouro coloidal puro 523nm indicando que ocorreu a conjugação de forma estável. Nos pHs 9,0 a 11,0 com aumento pH houve também aumento da instabilidade do conjugado evidenciado pela formação de picos alargados (representado em marrom) e de menor intensidade (representado em rosa e verde água). Fonte: Dados da pesquisa

Apesar da existência de um pH ótimo de adsorção (pH 8,0) é possível verificar nos diferentes pHs 8,0 a 11,0 a presença de adsorção entre rLicNTPDase2-Gold e ouro coloidal 40nm, uma vez que há formação de picos com deslocamento máximo de absorção em relação a absorbância do ouro coloidal puro (figura 34) e em análise visual a cor vermelha foi mantida sem a formação de precipitados (figura 29), isso ocorre, pois, a proteína apresenta um peptídeo que garante essa estabilidade de ligação. O design do peptídeo foi elaborado para permitir uma forte afinidade ao ouro devido a presença de um grupo tiol de ligação ao ouro coloidal, capacidade de automontagem com região hidrofóbica criando uma camada densa que exclui a água no seu interior e um terminal hidrofílico que garante estabilidade da ligação e solubilização em água. A construção do peptídeo baseou-se na conformação de proteínas não agregantes solúveis em água, que geralmente se dobras mantendo seus grupos hidrofóbicos na parte interior da macromolécula e grupos hidrofílicos são expostos à água, o que garante sua estabilidade biológica (LÉVY, R. e colaboradores, 2004).

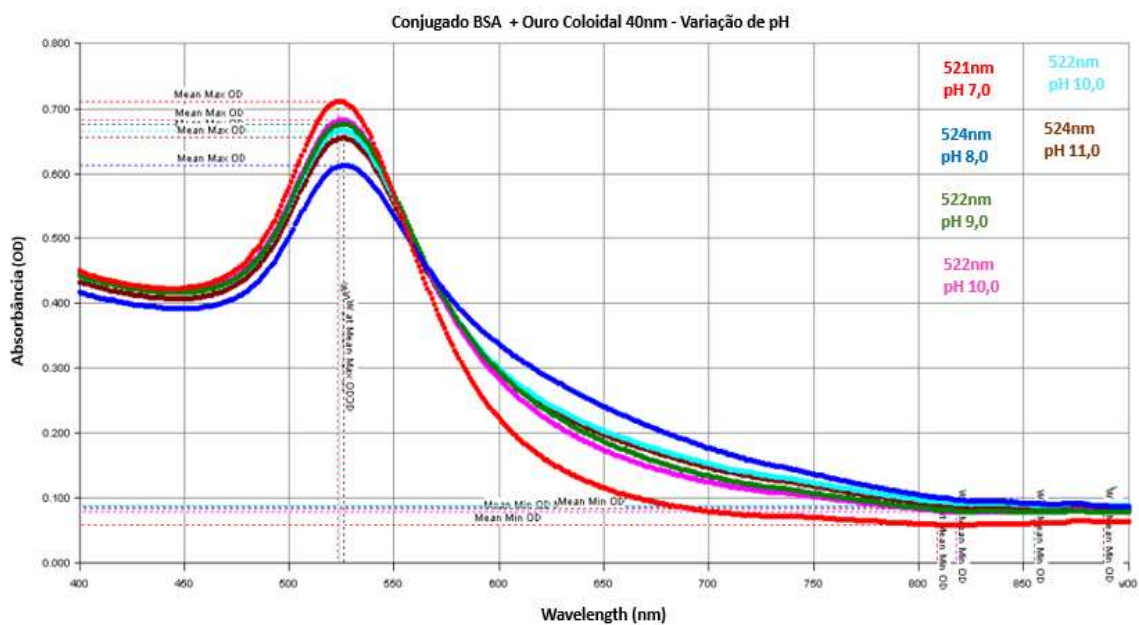
Os resultados de comparação de estabilidade da adsorção entre rLicNTPDase2-Gold e ouro coloidal 40nm em diferentes pHs e o conjugado preparado com ouro coloidal e a proteína

BSA (albumina sérica bovina) nas mesmas condições, sendo essa proteína escolhida devido algumas características como: albumina apresenta grande estabilidade, biocompatibilidade e realiza ligações com grupos dissulfeto e sulfidril que permite a interação com compostos orgânicos e inorgânicos. A BSA apresenta alta afinidade de ligação na formação de complexos ligante-proteína, e por meio eletrostático ou hidrofóbico reage com o ouro, ocorrendo interações entre nanopartículas de ouro e albumina. Devido à grande estabilidade de ligação, a albumina é utilizada na estabilização de nanopartículas de ouro utilizada para carregar e entregar fármacos ao local específico de ação na célula, sem sofrer agregação e destruição pelo sistema imunológico (NGHIEM *et. al.*; BOLAÑOS *et. al.*,2019).

O conjugado formado entre rLicNTPDase2-Gold e ouro coloidal 40 nm, preparado nas mesmas condições de testagem e concentração do conjugado BSA e ouro coloidal 40nm, apresentaram uma estabilidade semelhante, o que evidencia uma adsorção eficiente já que o BSA é conhecido pela alta eficiência de ligação ao ouro. A figura 35 apresenta o resultado do teste visual da adsorção entre BSA e ouro coloidal mediante alteração do pH. No primeiro poço foi adicionado ouro coloidal puro, nos demais poços foi adicionado 0,53µg de BSA e a partir do terceiro poço ocorreu ajuste do pH com adição de diferentes volumes de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0,1 M (1-10µL), onde a cor vermelha sem formação de precipitados se mantem em toda variação de pH 8,0 ao 11,0 (figura 35), assim como ocorreu no conjugado rLicNTPDase2-Gold e ouro coloidal 40 nm. Em análise espectro de absorção UV-visível (400–900 nm) é possível observar (figura 36) uma instabilidade da ligação em todas as suspensões coloidais (pH 8,0 ao 11,00) pela formação de picos alargados ou redução na intensidade dos picos em relação ao ouro coloidal puro. Para as interações eletrostáticas entre partículas de ouro e BSA deve ser considerados os parâmetros concentração, força iônica e pH. Como o ponto isoelétrico da albumina é aproximadamente 5, o pH ideal deve ser próximo a esse valor para regular o grau de ionização e manter a estabilidade de ligação, mas como o pH em questão é superior ao pI da albumina a estabilidade da reação foi afetada, havendo diminuição de BSA adsorvida devido ao aumento de cargas negativas presentes na proteína (BOLAÑOS *et. al.*,2019; CYTODIAGNOSTICS Inc., 2023). Porém devido à grande afinidade de ligação entre BSA e ouro coloidal, assim como em relação ao conjugado rLicNTPDase2-Gold e ouro coloidal (estabilizado pelo peptídeo), mesmo estando fora das condições ideais de pH e havendo diminuição da adsorção, houve formação do conjugado, sendo perceptível a manutenção da cor vermelha sem formação de precipitado (figura 35) e a presença de um deslocamento no pico máximo de absorção em relação a absorbância do ouro coloidal puro (figura 36).



**Figura 35: Avaliação visual das condições de adsorção da proteína BSA e ouro coloidal 40nm mediante alteração do pH.** Para verificar a interferência do pH ao processo de adsorção, volumes variados (0-10  $\mu$ L) de  $K_2CO_3$  0,1 M foram adicionados ao conjugado. O pH ótimo foi definido como o correspondente volume de  $K_2CO_3$  (0,1M) que manteve a cor da solução vermelha, sem alteração (vermelha para azul/roxa), o que indica conjugação sem formação de agregados. Fonte: Dados da pesquisa



**Figura 36: Análise da adsorção por espectro de absorção UV-visível da proteína BSA e Ouro coloidal 40nm em pH 8,0 ao 11,0.** A solução de ouro coloidal puro sem adição de NaCl (representado em vermelho) apresenta um pico agudo e leitura 521nm. Nos demais picos pHs 8,0 ao 11,0 houve instabilidade do conjugado evidenciado pela formação de picos alargados e de menor intensidade. Fonte: Dados da pesquisa

## 5.7 Resultados Teste de Funcionalização

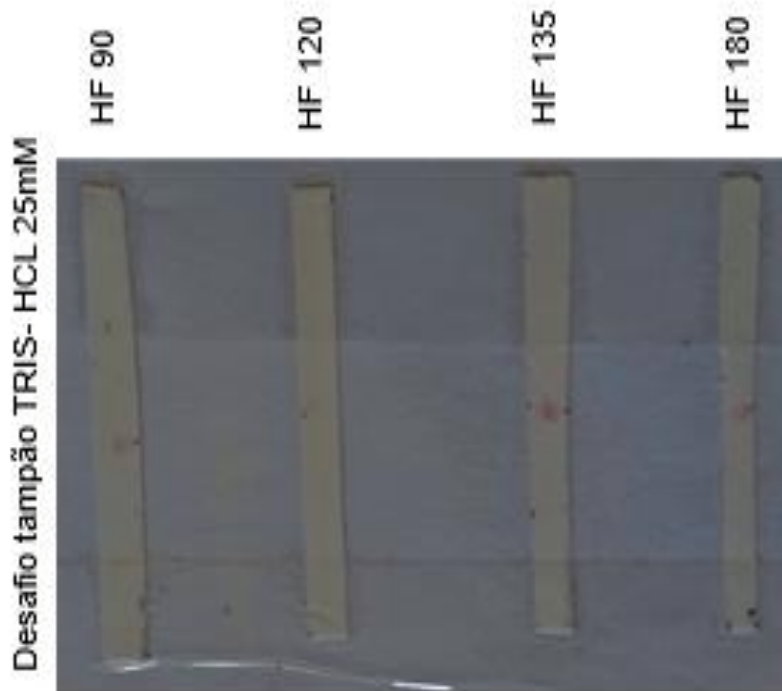
### 5.7.1 Escolha da Membrana

A matriz de reação constituída por uma membrana de nitrocelulose (MN) apresenta alta capacidade de ligação por interações entre a membrana e regiões hidrofóbicas da proteína e/ou interações eletrostáticas entre os dipolos dos grupos nitrato da nitrocelulose e aqueles intrínsecos à molécula proteica, possibilitando assim imobilização de diferentes proteínas dependendo de suas características químicas (MILLIPORE, 2015).

Como as membranas de nitrocelulose HI Flow Plus (Merck Millipore Ltda.) apresentam alto fluxo de capilaridade que varia com a porosidade HF 090, HF 120, HF 135 e HF 180, essas foram testadas para imobilização do anti-dog IgG na área teste, visto que a menor porosidade resulta em um tempo de fluxo capilar e sensibilidade maior e o aumento do fluxo capilar gera espalhamento dos reagentes impregnados nas áreas teste e controle, formando bandas mais largas e um sinal de detecção disperso, tornando difícil a visualização do resultado da reação, dessa forma como o fluxo capilar afeta no desempenho do teste rápido, a sua determinação torna-se um importante parâmetro para o desenvolvimento das tiras IFLA (CAMARGO, 2015).

As membranas imobilizadas foram desafiadas com diferentes tampões que podem ser utilizados para bloqueio da membrana nitrocelulose (reduzindo interações inespecíficas entre os analitos da amostra e a membrana, garantindo a reação com o imobilizado da área teste e controle) ou diluição da amostra como: Tris-HCL 25mM, pH 7,5; PBS tween 0,05% pH 8,0; PBS tween 0,1% pH 8,0 e PBS pH 8,0. Esses tampões apresentam surfactantes, detergentes e sais que podem auxiliar na uniformidade do fluxo por tornar a membrana hidrofílica, corrigir o pH da amostra e aumentar sua viscosidade, porém a alta concentração desses reagentes pode diminuir a adsorção das proteínas imobilizadas ao se ligar preferencialmente na membrana causando seu desprendimento ou provoca o alargamento da banda gerando perda do sinal (CAMARGO, 2015; MILLIPORE, 2015).

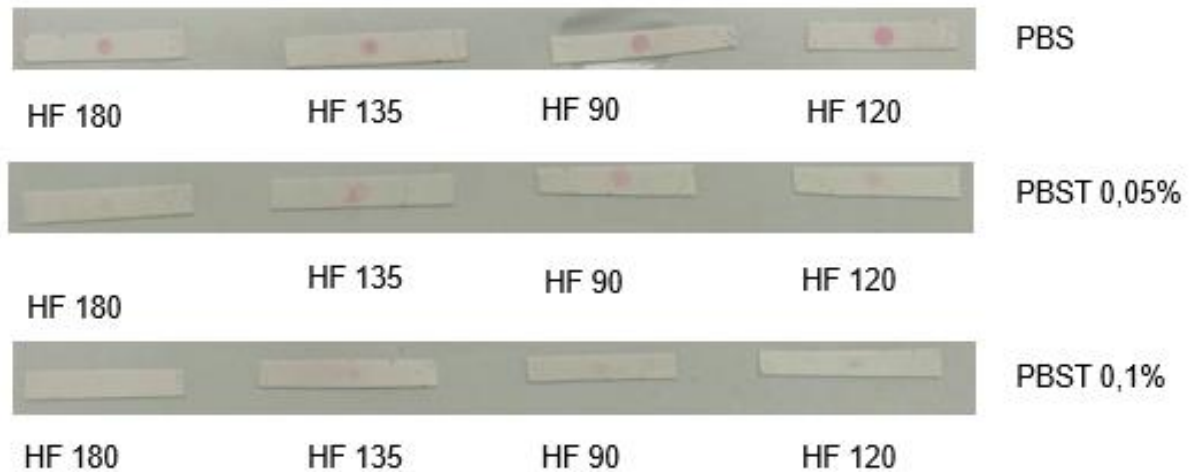
Primeiramente foi imobilizado 1 $\mu$ L (1 $\mu$ g) de anti-dog IgG, após a incubação por 30 minutos a 37 °C o imobilizado foi desafiado com os tampões de corrida Tris-HCL 25mM, pH 7,5. E para revelação utilizou-se a coloração direta de proteínas com Ponceau S (0,1% (m/v) em ácido acético 5%). Como resultado (Figura 37) o tampão Tris-HCL 25mM causou um maior desprendimento do imobilizado nas membranas HF 90 e HF 120 que apresentam menor porosidade e conseqüentemente maior tempo de fluxo capilar do que nas membranas HF 135 e HF 180 de maior porosidade e menor tempo de fluxo capilar, provavelmente os sais presente no tampão percorrendo sobre a membrana com menor porosidade e menor fluxo possibilitou maior tempo de interação com os constituintes da membrana (devido o maior tempo de fluxo capilar) resultando no desprendimento do imobilizado. Já a maior porosidade da MN HF180 aumenta o fluxo capilar provocando o espalhamento do anti-dog IgG formando um fraco sinal de detecção (MILLIPORE, 2015). A MN HF 135 apresentou o melhor resultado evidenciado pela intensidade da cor e tamanho do spot formado, onde o fluxo apresentou-se uniforme e o imobilizado estável a membrana, sendo essa escolhida para montagem das tiras teste.



**Figura 37: Avaliação da Imobilização de anti-dog IgG (1 $\mu$ g) desafiado com o tampão de diluição Tris-HCL 25mM, pH 7,5.** Foi imobilizado 1 $\mu$ L (1 $\mu$ g) de anti-dog IgG (H+L) (Kirkegaard & Perry Laboratories, Inc. USA), após a incubação por 30 minutos a 37 °C o imobilizado foi desafiado com o tampão de corrida Tris-HCL 25mM, pH 7,5. Para revelação utilizou-se a coloração direta de proteínas com Ponceau S (0,1% (m/v) em ácido acético 5%). O melhor resultado foi representado pela intensidade da cor vermelha e tamanho do spot formado. Fonte: Dados da pesquisa

Para teste com os tampões PBS tween 0,05% pH 8,0; PBS tween 0,1% pH 8,0 e PBS pH 8,0, foram imobilizados 3 $\mu$ L (3 $\mu$ g) do anti-dog IgG, uma vez que a imobilização com 1  $\mu$ L (1 $\mu$ g) apresentou uma pequena marcação e aplicação de um maior volume permite uma melhor visualização do resultado, assim após revelação com Ponceau S, observou-se (Figura 38) que o tampão PBS apresentou um fluxo uniforme sobre a membrana e não interferiu na adsorção do imobilizado, mesmo havendo alteração do fluxo capilar nas diferentes porosidades das MNs testadas, todas apresentaram um spots com coloração forte. Os Tampões PBST 0,05% e PBST 0,01% devido a presença de detergente (tween) promoveram o desprendimento do imobilizado observado pela redução da coloração e tamanho dos spots ou mesmo seu desaparecimento, que foi proporcional ao aumento da concentração (0,05% para 0,1%) do detergente e aumento do fluxo capilar sobre a membrana, isso ocorreu pois esses reagente se ligam preferencialmente a membrana e em altas concentrações podem diminuir a adsorção do imobilizado e o aumento do fluxo favorece o espalhamento dos reagentes sobre a membrana formando bandas mais largas e redução do sinal de detecção do anti-dog IgG (CAMARGO, 2015; MILLIPORE, 2015). Para otimização, estabelecendo apenas um tipo de membrana para montagem das tiras ILFA e realização dos demais testes de funcionalização, foi considerada a MN que apresentou um fluxo

uniforme e que manteve o anti-dog IgG imobilizado após ser desafiado com os tampões Tris-HCL 25mM pH 7,5; PBS tween 0,05% pH 8,0 e PBS pH 8,0, sendo esse resultado caracterizado pela presença de spots de cor forte. Como o tampão PBS tween 0,1 % pH 8,0 promoveu o alto desprendimento em todas as membranas foi desconsiderado para escolha da porosidade da MN, sendo assim a MN HF 135 foi determinada como padrão para os demais testes (Figura 37 e Figura 38).



**Figura 38: Avaliação da Imobilização de anti-dog IgG (3µg) desafiado com os tampões de diluição tampões PBS tween 0,05% pH 8,0; PBS tween 0,1% pH 8,0 e PBS pH 8,0.** Foi imobilizado 3µL (3µg) de anti-dog IgG (H+L) (Kirkegaard & Perry Laboratories, Inc. USA), após a incubação por 30 minutos a 37 °C o imobilizado foi desafiado com os tampões de diluição PBS tween 0,05% pH 8,0; PBS tween 0,1% pH 8,0 e PBS pH 8,0. Para revelação utilizou-se a coloração direta de proteínas com Ponceau S (0,1% (m/v) em ácido acético 5%). O melhor resultado foi representado pela intensidade da cor vermelha e tamanho do spot formado. Fonte: Dados da pesquisa

### 5.7.2 Desenvolvimento do teste imunocromatográfico de fluxo lateral (LFA)

O desenvolvimento de um sistema imunocromatográfico é complexo, pois é composto por diferentes matrizes e um grande número de componentes críticos combinados que podem interagir entre si e interferir no desempenho da tira e o correto funcionamento do teste (JAPOLLA et. al., 2015).

As tiras LFIA foram montadas sobre uma membrana adesiva dimensão 0,3 x 6 cm com sobreposição de outras membranas contendo 0,3 cm de largura para permitir encaixe ao cassete plástico, primeiramente MN HF 135 (membrana de reação) de 2,6 cm contendo o imobilizado da linha teste foi adicionada à 2 cm do início da fita adesiva, a fibra de vidro de 1,4 cm com o conjugado seco foi sobreposta a 0,5 cm da membrana de nitrocelulose e uma segunda fibra de vidro de 2 cm (membrana da amostra) foi sobreposta sobre a membrana do conjugado e o início da membrana adesiva, por fim a membrana de absorção de nitrocelulose com maior espessura

foi adicionada ao final da membrana adesiva. Após montagem das tiras, essas foram transferidas ao cassete plástico prosseguindo com os testes de funcionalização.

Inicialmente o modelo da tira LFIA (modelo 1) testada apresentava como imobilizado na linha teste anti-dog IgG, e como conjugado impregnado e seco na fibra de vidro a rLicNTPDase2-Gold e ouro coloidal 40nm como descrito no item 4.10.1. Dessa forma se a amostra de soro canino apresentar anticorpos para anti-LicNTPDase2 de *L. infantum*, esse ligaria ao conjugado que contém o antígeno formando um imunocomplexo seguindo o fluxo pela MN, ficando retido na linha teste que apresenta o anti-dog IgG, formando assim uma marcação vermelha circular devido a presença do ouro coloidal do conjugado. Para o preparo da membrana de reação, após imobilização da proteína de captura na área teste, essas foram incubadas por 30 minutos a 37 °C (De SOUZA, 2016). Após secagem as membranas foram bloqueadas com solução de PBST 0,1% e 3% de leite em pó, por 1 hora, em seguida realizado três lavagens de 5 min com PBST 0,1% e secagem das MN sobre placa de vidro. Como tampão de diluição e corrida da amostra foi utilizado o reagente Tris-HCL 25mM pH 7,5, avaliando seu efeito sobre o fluxo capilar e o arraste do conjugado ao longo da membrana, pois como testado e discutido (item 5.7.1) anteriormente o mesmo não interfere na adsorção do anti-dog IgG imobilizado na membrana. Como apresentado na figura 39, em ambos testes, com amostra positiva e amostra negativa para LVC, o fluxo capilar ocorreu de forma uniforme, porém o conjugado ficou retido na fibra de vidro.



**Figura 39: Resultado do ensaio realizado com tira LFIA modelo 1.** O modelo 1 da tira LFIA apresenta como imobilizado na linha teste anti-dog IgG, e como conjugado impregnado e seco na fibra de vidro a rLicNTPDase2-Gold + ouro coloidal 40nm. A formação de uma marcação vermelha circular indica um resultado reagente (positivo) e ausência dessa marcação um resultado não reagente (negativo). No teste positivo foi utilizado amostra positiva para LVC e no teste negativo amostra negativa para LVC, em ambos testes foi usado solução diluente Tris-HCL. Fonte: Dados da pesquisa

Geralmente a presença de altas concentrações de sais na solução coloidal ou no tampão de corrida do teste rápido, pode mascarar a carga negativa em cada partícula de ouro, e os efeitos

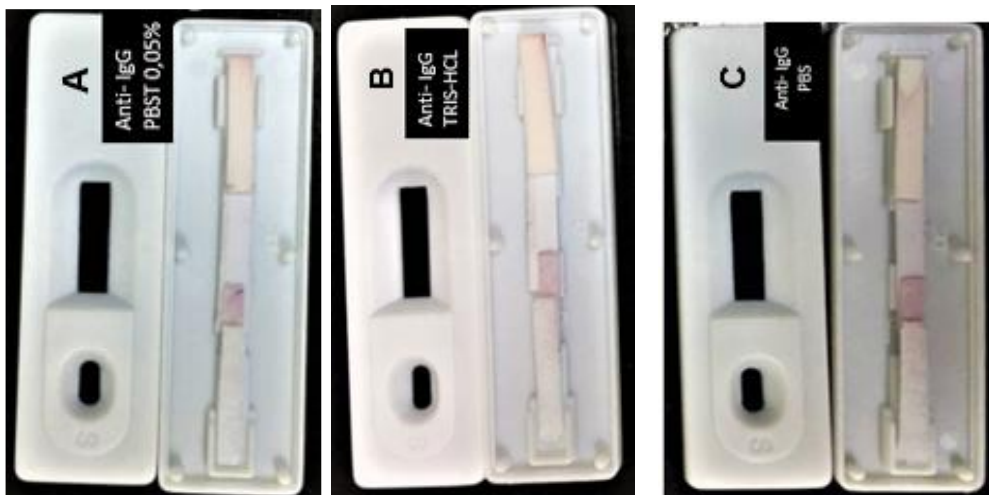
de repulsão negativa, assim as partículas de ouro adsorvem uma as outras formando grandes agregados (CYTODIAGNOSTICS Inc., 2023; HERMANSON, 2007). Porém em estudos realizados por Lévy, R. e colaboradores, 2004, demonstraram que o peptídeo adicionado para formação da rLicNTPDase2-Gold, somado com cloreto de sódio formam uma camada peptídica sobre a superfície das nanopartículas de ouro coloidal, fornecendo uma proteção imediata dessas partículas a agregação induzida pelo eletrólito. Em análise por espectrofotômetro, a absorção aumenta ligeiramente com um deslocamento de 2 nm do pico máximo e esse resultado se mantém estável por semanas. Além disso as nanopartículas de ouro coloidal cobertas com o peptídeo são estáveis sem alteração detectável no espectro de absorção UV-vis até uma concentração de NaCl de 1 M em pH 7,0. O que pode justificar o fato do conjugado não se desprender da fibra de vidro e mover junto a com a amostra em direção à membrana de nitrocelulose, provavelmente a adsorção entre rLicNTPDase2-Gold e ouro coloidal 40nm se compactou, uma vez que a proteína apresenta-se em tampão que contém NaCl (Tampão carbonato) e o tampão de corrida adicionado contém cloreto e outros eletrólitos (Tris-HCL) auxiliando na formação da camada protetora, dificultando seu arraste.

Outro fator a ser considerado para não haver marcação vermelha circular na área teste das tiras contendo amostra positiva, seria o desprendimento do anti-dog IgG da MN, uma vez que em testes de desafio do tampão PBST 0,1% sobre a MN HF 135 imobilizado com anti-dog IgG demonstraram que o efeito do detergente tween na concentração 0,1% promove alto desprendimento da proteína ao competir pela ligação a MN. Porém quando realizado o protocolo em questão com bloqueio da membrana utilizado PBST 0,1% o efeito do tampão no desprendimento do anti-dog IgG era desconhecido, sendo realizado os testes como discutido no item 5.7.1 para confirmar essa hipótese.

Como alternativa para desprender o conjugado da fibra de vidro, aumentar sua estabilidade e promover uma corrida uniforme, foi alterado a forma de preparo do conjugado como descrito no item 4.10.2.2, sendo adicionado o tampão borato pH 8,0 pois esse apresenta ação tensoativa auxiliando a solubilização do conjugado aos analitos da amostra, e em pH 8,0 apresenta-se mais básico em relação ao PI (7,63) da rLicNTPDase2-Gold que teoricamente expõe seus grupos hidrofóbicos favorecendo a adsorção ao ouro coloidal e aumentando a estabilidade do conjugado (MILLIPORE, 2008). Adicionado a isso foram testados outros tampões de diluição como PBS tween 0,05% pH 8,0 e PBS pH 8,0 para avaliar a utilização de detergentes e surfactantes auxiliaria no fluxo capilar e no arraste do conjugado ao longo da membrana. Ao analisar a figura 40 é perceptível a presença do arraste do conjugado ao longo

da membrana com deposição de fragmentos do conjugado na membrana de absorção ao final da tira de teste nos três tampões testados para amostra positiva da LVC, o que sugere que a modificação do tampão apresentou mudanças significativas ao fluxo e arraste do conjugado ao ser comparado com o tampão Tris-HCL testado anteriormente, indicando ainda que o novo protocolo de preparo do conjugado apresentou melhor eficiência onde a ação tensoativa do tampão borato pode ter auxiliado a solubilização do conjugado aos analitos da amostra, porém aparentemente a concentração do conjugado na fibra de vidro foi insuficiente para marcação do anti-dog IgG na área teste, sendo necessário a realização de novos testes para aumentar a concentração do conjugado.

Para os testes, figura 40, o bloqueio das membranas de nitrocelulose foi realizado com solução de BSA 3% em PBS pH 8, por 1 hora, visto que o tampão PBST 0,1% promove alto despendimento do imobilizado da MN e PBS não afeta a adsorção como discutido no item 5.7.1, assim como houve arraste do conjugado pela membrana nos diferentes tampões de diluição testados e não houve presença da marcação vermelha circular na área teste e o tampão de bloqueio da membrana não afetaria a adsorção do anti-dog IgG na MN, fica evidente a hipótese da necessidade de aumentar a concentração do conjugado para melhor performance do teste.



**Figura 40: Resultado do ensaio realizado com tira LFIA modelo 1, utilizando diferentes tampões de diluição.** O modelo 1 da tira LFIA apresenta como imobilizado na linha teste anti-dog IgG, e como conjugado impregnado e seco na fibra de vidro a rLicNTPDase2-Gold + ouro coloidal 40nm. A formação de uma marcação vermelha circular indica um resultado reagente (positivo) e ausência dessa marcação um resultado não reagente (negativo). Para esses testes foram utilizados amostra positiva para LVC. (A) Foi usado solução diluente Tris-HCL, (B) Foi usado solução diluente PBST 0,05%, (C) Foi usado solução diluente PBS. Fonte: Dados da pesquisa

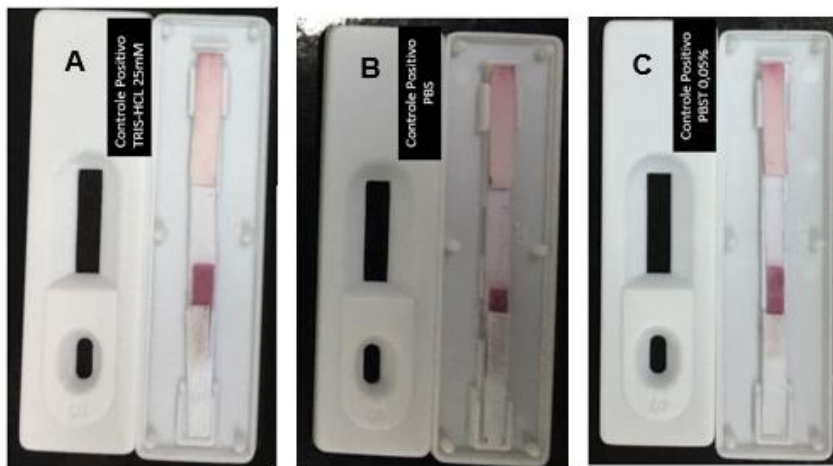
Para controle foi utilizado o conjugado comercial proteína A e ouro coloidal 40 nm (Fitzgerald industries internacional INC.) e IgG de cão (2,5µg) imobilizado em uma MN HF 135 diferente da utilizada para revelar o resultado do teste (contendo anti-dog IgG imobilizada), pois a proteína A tem capacidade de interagir com qualquer IgG de cão presente em uma

amostra e posteriormente reagiria na linha teste que contém anti-dog IgG gerando uma marcação devido a presença do ouro coloidal presente no conjugado, gerando assim um resultado falso-positivo. A escolha desse modelo como controle baseou-se em estudos anteriores realizados por nosso grupo de pesquisa, De Souza (2016) realizou imobilização IgG comercial de cão na concentração 2,5  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  em membranas de nitrocelulose (BIO-RAD 0,45  $\mu\text{m}$ ), ao revelar com Proteína A conjugada ao ouro coloidal 40nm (comercial) em ensaio dot blot houve formação de spots denso e com coloração forte indicando uma adsorção estável, já estudos realizados por Castro (2022) onde foi avaliado a imobilização do IgG comercial em membranas de nitrocelulose (BIO-RAD 0,45  $\mu\text{m}$ ), desafiado com PBS e PBST 0,05% no experimento revelado com Ponceau S, a proteína se manteve adsorvida à membrana.

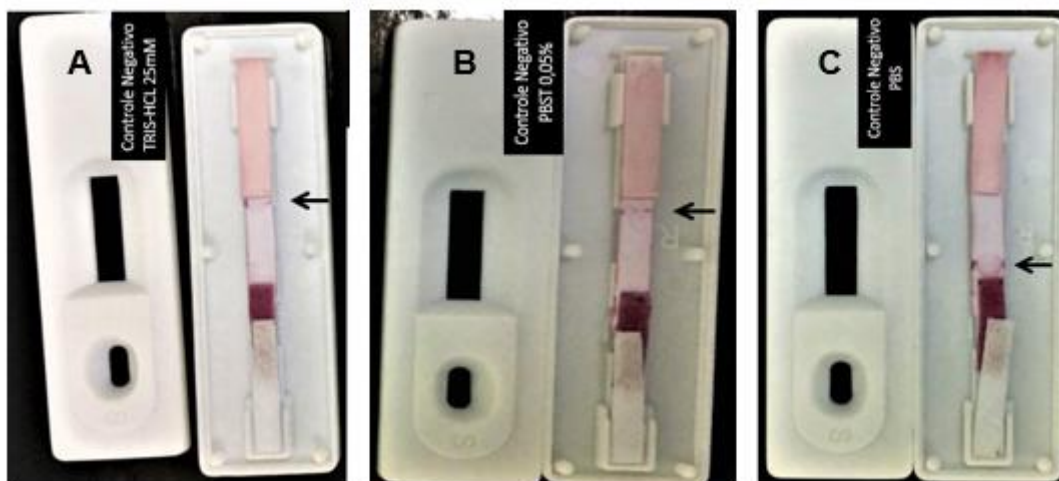
O resultado dos testes realizados utilizando os tampões diluentes Tris-HCL 25mM pH 7,5; PBS tween 0,05% pH 8,0 e PBS pH 8,0, com intuito de observar o comportamento dos mesmos sobre o fluxo capilar e arraste do conjugado ao longo da membrana. Tanto nos testes com amostras positivas (figura 41) quanto nos testes com amostras negativas (figura 42) os diferentes diluentes testados promoveram um fluxo uniforme e arraste do conjugado ao longo da membrana com deposição do conjugado na membrana de absorção, porém a tonalidade avermelhada gerada pelo ouro coloidal nas membranas absorventes das tiras com amostra negativa apresentaram-se mais fortes em relação às positivas, possivelmente no processo de secagem do conjugado algumas fibras de vidro apresentaram uma menor impregnação e foram montadas em tiras testadas com amostras positivas, isso pode justificar a presença de um sinal circular de reação nos controles negativos e ausência nos controles positivos, indicando a necessidade de aumentar a concentração do conjugado na fibra de vidro para possibilitar melhor revelação da área controle.

Analisando individualmente os controles negativos que apresentaram reatividade. O tampão Tris-HCL apresentou uma marcação de coloração fraca próxima a membrana absorvente como apresentado na figura 42a sendo possível verificar uma falha na montagem da tira que dificulta a visualização circular do IgG de cão imobilizado na MN, sendo assim a influência do tampão de diluição não pode ser avaliada, sendo necessário a realização de novos testes. O Tampão PBS pH 8,0 promoveu um fluxo uniforme e o arraste do conjugado até a região controle que na montagem da tira teste ficou próxima a fibra de vidro (figura 42c), que não impossibilitou a marcação vermelha circular, geralmente quando o analito presente no fluxo passa rapidamente pelo reagente de captura ocorre a redução da interação entre eles e conseqüente redução da sensibilidade, sendo indicada a fixação da banda de reação mais

distante da membrana do conjugado (MILLIPORE, 2008), mas nessa situação devido à grande proximidade a interação pode ter sido favorecida com o arraste de um conjugado concentrado até a área teste. O Tampão PBST 0,05% pH 8,0 apresenta uma marcação vermelha que não é característica da banda controle (figura 42b), visto que o IgG de cão foi imobilizado na forma circular formada pela gota da proteína, possivelmente o detergente presente no tampão promoveu a remoção do imobilizado da área controle, porém como não houve uma marcação circular forte precisa e na altura correta de fixação da banda controle em nenhum dos testes realizados tanto para amostra positiva quanto negativa. Outra hipótese relaciona-se à falha na imobilização do IgG de cão, visto que os testes utilizados como parâmetro para determinação da concentração de IgG que foi utilizada nesse trabalho foram realizados em membrana de nitrocelulose diferente da utilizada atualmente e, como a porosidade da MN determina a velocidade de fluxo capilar, um aumento no fluxo capilar dos reagentes espalham as proteínas adsorvidas na área controle reduzindo o sinal de detecção e a visualização da reação (MILLIPORE, 2015). A adsorção também depende das características da membrana como hidrofobicidade, as MN HI Flow Plus HF 135 utilizada no presente trabalho são tratadas para se tornar hidrofílicas auxiliando no fluxo capilar por causar bloqueio na membrana e evitar interações inespecíficas. Como uma das formas de adsorção da proteína a membrana é por meio de interações hidrofóbicas entre essa e regiões hidrofóbicas da proteína, as membranas de nitrocelulose (BIO-RAD 0,45  $\mu\text{m}$ ) utilizada nos testes preliminares provavelmente apresenta uma maior afinidade de ligação ao IgG de cão devido as características hidrofóbicas que são reduzidas na MN HI Flow Plus HF 135. Dessa forma torna-se necessário a realização de testes de imobilização do IgG de cão na membrana de MN HI Flow Plus HF 135 e desafio com os tampões Tris-HCL 25mM pH 7,5; PBS tween 0,05% pH 8,0 e PBS pH 8,0 para determinar a melhor concentração de aplicação do IgG de cão e a influência do tampão sobre a adsorção da proteína.



**Figura 41: Resultado do ensaio realizado com tira LFIA Controle Positivo, utilizando diferentes tampões de diluição.** O modelo da tira LFIA controle apresenta como imobilizado na linha teste IgG de cão, e como conjugado impregnado e seco na fibra de vidro Proteína A + ouro coloidal 40nm (comercial). A formação de uma marcação vermelha circular indica um resultado reagente (positivo) indicando validação do teste e ausência dessa marcação um resultado não reagente (negativo) indica teste inválido. Para esses testes foram utilizados amostras positivas para LVC. (A) Foi usado solução diluente Tris-HCL, (B) Foi usado solução diluente PBST 0,05%, (C) Foi usado solução diluente PBS. Fonte: Dados da pesquisa



**Figura 42: Resultado do ensaio realizado com tira LFIA Controle Negativo, utilizando diferentes tampões de diluição.** O modelo da tira LFIA controle apresenta como imobilizado na linha teste IgG de cão, e como conjugado impregnado e seco na fibra de vidro Proteína A + ouro coloidal 40nm (comercial). A formação de uma marcação vermelha circular indica um resultado reagente (positivo) indicando validação do teste e ausência dessa marcação um resultado não reagente (negativo) e indica teste inválido. Para esses testes foram utilizadas amostras negativas para LVC. (A) Foi usado solução diluente Tris-HCL, (B) Foi usado solução diluente PBST 0,05%, (C) Foi usado solução diluente PBS. Fonte: Dados da pesquisa

Como o preparo do conjugado rLicNTPDase2-Gold e ouro coloidal 40nm está sendo desafiador, outro modelo de montagem das tiras de teste rápido (denominado modelo 2) foi desenvolvido para avaliar a funcionalidade da rLicNTPDase2-Gold em reconhecer e reagir com anticorpos LVC em ensaio imunocromatográfico, pois o ensaio ELISA apresentou resultados satisfatórios para confirmar a funcionalidade da proteína, com acurácia de 96,18%,

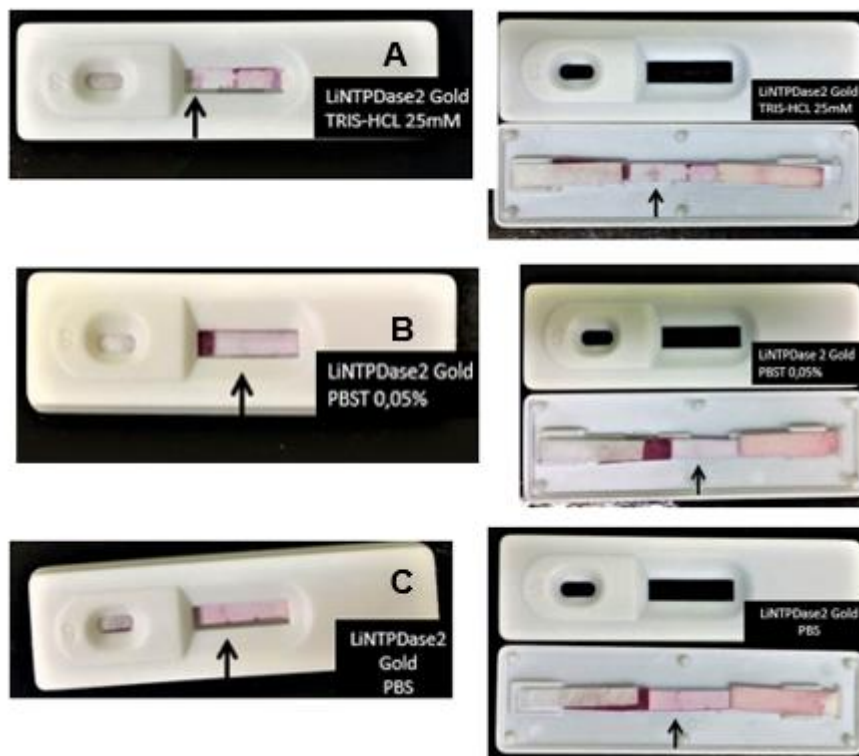
sensibilidade de 70,83 % e especificidade de 100%. Sendo assim, nesse modelo 1,30  $\mu\text{g}$  da rLicNTPDase2-Gold foi imobilizado na área teste da MN HI Flow Plus HF 135, para controle aplicou-se o volume correspondente à massa desejada de IgG (2,5 $\mu\text{g}$ ) também formando uma gota. A etapa de preparo da membrana de reação foi igual à do o modelo 1, essas foram incubando por 30 minutos a 37 °C (De SOUZA, 2016). Após secagem as membranas foram bloqueadas com solução de BSA 3% em PBS pH 8, por 1 hora, em seguida foram realizadas três lavagens de 5 min com PBS pH 8 e secagem das MN. O conjugado da proteína A comercial adsorvida ao ouro coloidal 40nm foi adicionado e seco na fibra de vidro. As etapas de montagem das tiras também seguiram o padrão do modelo1 da tira teste. Dessa forma se a amostra de soro canino apresentar anticorpos para *Leishmania infantum*, esse se ligará à proteína A seguindo o fluxo pela MN ficando retido na linha teste que apresenta o antígeno e a presença do ouro 40nm conjugado a proteína A revelará a reação formando uma marcação vermelha circular.

Os tampões Tris-HCL 25mM pH 7,5; PBS tween 0,05% pH 8,0 e PBS pH 8,0 foram testados para avaliar o efeito de cada tampão sobre o fluxo capilar e o arraste do conjugado ao longo da membrana, pois não foi realizado nenhum teste de imobilização da rLicNTPDase2-Gold na membrana de MN HI Flow Plus HF 135 ou desafio com esses tampões para determinar a melhor concentração de aplicação da proteína e a influência do tampão sobre o desprendimento do imobilizado da membrana, visto que a presença de Surfactantes e detergentes no tampão de diluição podem afetar a adsorção da proteína se ligando preferencialmente na membrana ou formando um complexo com a molécula da proteína antes dela adsorver (MILLIPORE, 2015).

Nos testes de funcionalização realizados (figura 44) utilizando amostra de soro positivo para LVC, nas três tiras, cada uma testada com um dos tampões diluente (Tris-HCL, PBS e PBST 0,05%) é possível verificar um fluxo capilar uniforme com arraste do conjugado (proteína A e ouro coloidal 40nm) ao longo da membrana de reação caracterizado pela coloração avermelhada na membrana de absorção, indicando o depósito do conjugado. Os três ensaios apresentaram resultado reagente evidenciado pela marca circular vermelha na área teste onde está depositado o antígeno, porém a tira teste que foi utilizada o tampão diluente Tris-HCL (figura 43A) apresentou como resultado uma cor forte e bem delimitada em relação as outras tiras utilizando o tampão PBS (figura 43C) e PBST 0,05% (figura 43B), possivelmente pelo conhecido efeito de surfactantes e detergentes presente nesses tampões, em afetar a adsorção da proteína se ligando preferencialmente na membrana promovendo o desprendimento da proteína adsorvida. Assim uma alternativa para a realização de novos testes seria o aumento da

concentração da rLicNTPDase2-Gold imobilização na MN e a utilização do tampão diluente Tris-HCL que aparentemente não afeta sua adsorção.

Os três ensaios (figura 43) não apresentaram reatividade na área controle, ao qual estava imobilizada IgG de cão. Como a concentração da proteína utilizada (2,5 $\mu$ g) foi igual à dos ensaios anteriores que também não apresentaram resultado reagente, confirma-se a necessidade do aumento da concentração dessa proteína no processo de adsorção da MN para permitir reatividade ao teste. Também é notável que apesar da ocorrência do arraste do conjugado pela membrana, foi maior a quantidade que permaneceu na fibra de vidro, sendo necessário testar novas alternativas para aumentar a solubilização e arraste do conjugado, como por exemplo o uso de reagentes com ação tensoativa como o tampão borato, nas etapas de preparo e secagem do conjugado a fibra de vidro.



**Figura 43: Resultado do ensaio realizado com tira LFIA modelo 2, utilizando diferentes tampões de diluição.** O modelo 2 da tira LFIA apresenta como impregnado e seco na linha teste o antígeno rLicNTPDase2-Gold e controle IgG de cão. Como conjugado impregnado e seco na fibra de vidro a Proteína A + ouro coloidal 40nm (comercial). A formação de uma marcação vermelha circular indica um resultado reagente (positivo) e ausência dessa marcação um resultado não reagente (negativo). Para esses testes foram utilizados amostra positiva para LVC. (A) Foi usado solução diluente Tris-HCL, (B) Foi usado solução diluente PBST 0,05%, (C) Foi usado solução diluente PBS. Fonte: Dados da pesquisa

Por fim é válido perceber que a proteína rLicNTPDase2-Gold é um antígeno funcional para realização de ensaio imunocromatográfico rápido de fluxo lateral, já que neste teste preliminar foi capaz de reagir com anticorpos presentes em amostra de cão portador de LVC.

Novos ensaios deverão ser realizados afim de aprimorar o desenvolvimento dos dois modelos de tiras de teste rápido e seu desempenho, e assim prosseguir as etapas de validação para confirmar a aplicabilidade desses testes no diagnóstico de LVC.

## 6. CONCLUSÃO

Os dados do presente trabalho confirmam que o antígeno rLicNTPDase2-Gold tem potencial para o diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina. Em testes preliminares de ensaio imunocromatográfico rápido de fluxo lateral (modelo 2) e ELISA a proteína rLicNTPDase2-Gold se mostrou um antígeno funcional capaz de ser reconhecido e interagir com anticorpos específicos presente em amostra positiva para LVC.

A produção da rLicNTPDase2-Gold foi padronizada visando otimização do tempo e considerando a concentração da proteína, assim foi estabelecido o sistema de expressão *E. coli* C41(DE3), e parâmetros de indução IPTG 0,2mM, 37°C, 2 horas, 180 RPM. A recuperação das proteínas nos corpos de inclusão em baixa concentração de ureia (1M), associada a um processo de congelamento e descongelamento em pH alcalino e etapas de lavagem (lise L5), aplicada ao protocolo P6 de purificação por cromatografia de afinidade em FPLC resultou na obtenção de proteínas com uma melhor pureza qualitativa e concentração de 1,3707 mg/mL, superior a mínima necessária para desenvolvimento de tiras ILFA (0,5mg/mL). Além disso, a proteína se manteve estável na temperatura -20°C e 4°C após 30 dias de purificação, o que viabiliza sua utilização no desenvolvimento de testes rápidos que poderão ser armazenamento em caixas térmicas na temperatura 4°C e utilizados em trabalho de campo.

Nos testes de adsorção, o antígeno purificado foi capaz de formar ligações estáveis ao ouro coloidal 40nm e apesar da existência de um pH ótimo para formação de conjugados estáveis (pH 8,0), foi possível verificar a presença de adsorção entre rLicNTPDase2-Gold e ouro coloidal 40nm nos diferentes pHs (8,0 ao 11,0) testados, o que comprova que a adição do peptídeo na construção do antígeno garantiu a estabilidade de ligação ao ouro coloidal 40nm (molécula reveladora).

Os testes de funcionalização foram realizados em dois modelos (1 e 2) de tiras ILFA, utilizando os tampões Tris-HCL pH 7,0; PBS pH 8 e PBST 0,1% pH 8,0 para diluir amostra positiva para LVC. No modelo 1, não houve resultado positivo, porém ocorreu arraste do conjugado pela MN e como o tampão de bloqueio e os tampões de diluição não afetam a adsorção do anti-dog IgG imobilizado na área teste. Fica assim evidente, a necessidade de aumentar a concentração do conjugado para permitir revelação dos testes. Já no modelo 2, os três ensaios apresentaram resultado (positivo), porém a utilizada do tampão diluente Tris-HCL resultou na formação de uma cor forte e bem delimitada em relação aos outros tampões testados, que continha surfactantes e detergentes, afetando a adsorção da proteína promovendo seu

desprendimento da MN. Assim para a realização dos novos testes será necessário o aumento da concentração da rLicNTPDase2-Gold immobilizada na MN e a utilização do tampão diluente Tris-HCL que aparentemente não afeta sua adsorção.

Os testes realizados utilizando como controle o IgG de cão na concentração de 2,5µg immobilizado na MN não apresentaram boa reatividade, sendo necessário o aumento da concentração dessa proteína para permitir melhor performar-se do teste, além disso é preciso aumentar a solubilização e arraste do conjugado, pois apesar da ocorrência do arraste nesses ensaios, a quantidade de conjugado que permaneceu aderido a fibra de vidro foi maior.

Sendo assim, novos ensaios deverão ser realizados para aprimorar o desenvolvimento e desempenho das tiras LFIA a fim de obter a validação de um kit sensível e específico para diagnóstico rápido indireto LVC.

## 7. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- AGONIGI, B. N. da S. Avaliação do perfil sorológico de cães imunizados com a vacina Leish-Tec® frente a testes utilizados no imunodiagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina. 2020. 85 f. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública e Meio Ambiente) - **Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca**, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2020.
- ALBUQUERQUE A.L.H, LANGONI H. A prática do tratamento na Leishmaniose visceral canina (LVC) em clínicas veterinárias, cuidados e protocolos. **Revista Veterinária** e v. 25, n. 1, p. 132-141, jun. 2018.
- ALVES, A. S. Avaliação da sororretividade cruzada entre a infecção por *Trypanosoma caninum* e a leishmaniose visceral canina. 2012. 42 f. Dissertação (Mestrado em Pesquisa Clínica em Doenças. Infeciosas) - **Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas**, Rio de Janeiro, RJ, 2012.
- ANDRADE, A. M. et al. Reposição de cães em área endêmica para leishmaniose visceral. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, [S.L.], v. 40, n. 5, p. 594- 595, out. 2007.
- BAESHEN MN, AL-HEJIN AM, BORA RS, AHMED MM, RAMADAN HA, SAINI KS, BAESHEN NA, REDWAN EM. Production of Biopharmaceuticals in *E. coli*: Current Scenario and Future Perspectives. **J. Microbiol. Biotechnol.**, 25(7), pp 953- 962. 2015.
- BASTOS, M. S. *et al.*; The expression of NTPDase1 and-2 of *Leishmania infantum chagasi* in bacterial and mammalian cells: Comparative expression, refolding and nucleotidase characterization. **Protein expression and purification**, v. 131, p. 60-69, 2017.
- BOLAÑOS, K.; KOGAN, M. J.; ARAYA, E. Capping gold nanoparticles with albumin to improve their biomedical properties. **International Journal of Nanomedicine** 2019:14. 2019.
- BRADFORD, Marion M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.
- BRASIL. Portaria Interministerial nº 1.426, de 11 de julho de 2008. Proíbe o tratamento de leishmaniose visceral canina com produtos de uso humano ou não registrados no **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**. Diário Oficial da União. Brasília, DF, n. 133, 14 jul. 2008. Seção 1, pt. 37.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Secretaria de Vigilância em Saúde. Coordenação Geral de Desenvolvimento da Epidemiologia em Serviços**. Guia de Vigilância em Saúde, volume único. 3ª. ed. Brasília, Ministério da Saúde, 2019. 740 p. ISBN 978-85-334-2706-8.
- BRASIL. **Ministério da Saúde**. Situação epidemiológica da Leishmaniose Visceral. Casos confirmados de leishmaniose visceral, Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 1990 a 2020. Brasília, maio de 2022. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/l/leishmaniose-visceral/situacao-epidemiologica-da-leishmaniose-visceral>
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. **Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde**,

**Departamento de Vigilância Epidemiológica.** 1. ed., 5. reimpr. Brasília: Ministério da Saúde, 2014. 120 p.: il. ISBN 978-85-334-0742-8

BRASIL, Ministério da Saúde, **Nota Técnica Conjunta nº 01 /2011-CGDT-CGLAB/DEVIT/SVS/MS.** Processo Nº 25000.227. 865/2011-17; 2011. Disponível em: [http://www.sgc.goias.gov.br/upload/arquivos/2012-05/nota-tecnica-no.-1-2011\\_cglab\\_cgdt1\\_lvc.pdf](http://www.sgc.goias.gov.br/upload/arquivos/2012-05/nota-tecnica-no.-1-2011_cglab_cgdt1_lvc.pdf). Acesso em: 04 de outubro de 2022.

BRASILEISH - Grupo de Estudo em Leishmaniose Animal (2018). Diretrizes para o diagnóstico, estadiamento, tratamento e prevenção da leishmaniose canina. Três Lagoas, MS: **Editora Agitta.** 2018.

BURNSTOCK, G. Purine and pyrimidine receptors. **Cell. Mol. Life Sci.**,2007, V.64 (12). p. 1471-1483. DOI: 10.1007/s00018-007-6497-0. 2007.

CAMARGO, Maria Angélica. Metodologia de desenvolvimento e validação de kit imunocromatográfico adotando como modelo o teste rápido para detecção do Hormônio Luteinizante (LH). 2015. Dissertação (Mestre em Genética Evolutiva e Biologia Molecular). Centro de Ciências Biológicas e da Saúde Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular. **Universidade Federal de São Carlos.** São Carlos, SP, 2015.

CARDOSO, A. M., SPANEVELLO, R. M., MANFREDI, L. H., and MACIEL, S. F. V. O. Sinalização purinérgica e suas implicações fisiológicas. Chapecó: **Editora UFFS,** pp. 15-27. ISBN:978-65-86545-47-0.2021. Disponível em: <https://doi.org/10.7476/9786586545494.0001>

CASTRO, R. B. et al. Urea, salts, and Tween 20 influence on adsorption of IgG and Leishmania rNTPDase2 to nitrocelulose. **Analytical Biochemistry** 646 (2022) 114648. 2022.

COSTA, E. M. Aplicabilidade de testes rápidos para vigilância e controle da Leishmani Visceral Canina em áreas endêmicas. 2019. 185 f. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular) - **Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro,** 2019.

COSTA, D. N. C. C. et al. Controle da leishmaniose visceral canina por eutanásia: estimativa de efeito baseado em inquérito e modelagem matemática. **Cadernos de Saúde Pública,** [S.L.], v. 36, n. 2, fev. 2020.

CDC, **Centers for Disease Control and Prevention,** outubro de 2022. Disponível em: <https://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/index.html>

CHALFUN, M.; COSENZA, F. O. S. R. Direito dos animais e o controle da leishmaniose: novas perspectivas. **Revista de Biodireito e Direito dos Animais.** e-ISSN: 2525-9695, Salvador, v. 4, n. 1, p. 22 – 41 | Jan/Jun. 2018.

CYTODIAGNOSTICS INC. Introduction to Gold Nanoparticle Characterization. **Cytdiagnostics Inc** ©. Canada, USA, 2023.

DANTAS-TORRES F., SALES K.G.S., da SILVA L.G., OTRANTO D., FIGUEREDO L.A. Level of agreement between two commercially available rapid serological tests and the official screening test used to detect Leishmania seropositive dogs in Brazil. **Vet J.** 2018; 234:102-104. doi: 10.1016/j.tvjl.2018.02.007.

De SOUZA, R. F. Expressão e Purificação da Proteína Recombinante NTPDase2 de *Leishmania infantum* e sua Aplicação no Imunodiagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina. Tese de Doutorado apresentada à **Universidade Federal de Viçosa**. 2012.

De SOUZA, R.F., SANTOS, Y.L, VASCONCELLOS, R.S., BORGES-PEREIRA, L., CALDAS, I.S., ALMEIDA, M.R., BAHIA, M.T., FIETTO, J.L.R., Recombinant *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum* Ecto-Nucleoside Triphosphate Diphosphohydrolase NTPDase-2 as a new antigen in canine visceral leishmaniasis diagnosis. **Acta Tropica** (125),1, pp 60–66. 2013.

De SOUZA, Anna Cláudia Alves. Aprimoramento do diagnóstico de Leishmaniose Visceral Canina por ELISA usando o antígeno NTPDase-2 de *Leishmania* (*leishmania*) *infantum* chagasi e padronização do diagnóstico por imunocromatografia. 2016. Dissertação (Mestrado em Bioquímica Aplicada) Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, **Universidade Federal de Viçosa**, Viçosa, MG, 2016

De SOUZA, A. C. A., CASTRO, R. B, SANTOSA, Y. L., PAVIONED, N. R. T, AGRIPINO, J. M., BAHIA. M. T., COELHO, G. L. L. M, SOUZA, R. F, OLIVEIRA, L. L., De SOUZA, C. S. F, COSTA BRESSANA, G. C., VASCONCELLOS, R. S., ALMEIDA, M. R., FIETTO, J. R. F. High Performance of ELISA test using recombinant rLicNTPDase2 from *Leishmania infantum*: a Phase II diagnosis of Canine Visceral Leishmaniasis. **Acta Tropica** 209, 2020. Disponível: <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2020.105535>.

FIETTO, J. L. R. *et al.*; Characterization and immunolocalization of an NTP diphosphohydrolase of *Trypanosoma cruzi*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 316, n. 2, p. 454–460, 2004.

FUNED (FUNDAÇÃO EZEQUIEL DIAS). Manual do Programa de Avaliação da Qualidade Imunodiagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina. **Divisão de Epidemiologia e Controle de Doenças Serviço de Doenças Parasitárias Laboratório de Referência Nacional para o Diagnóstico da Leishmaniose Visceral**. 2016. Disponível em: <http://funed.mg.gov.br/> Acesso: 05/10/2022.

GOMES, R. S. *et al.*; E-NTPDase (ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase) of *Leishmania amazonensis* inhibits macrophage activation. **Microbes and Infection**, v. 17, n. 4, p. 295–303, 2015.

GOMES, G. M. T. Avaliação da estabilidade de amostras positivas para Leishmaniose visceral canina. 2016. 87 f. Dissertação (Mestrado em Vigilância Sanitária)-Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, **Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro**, 2016.

GOMES, A. C. A., FUJIWARA, R. T.; Avaliação do antígeno RKDDR-plus para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina em abrigos de animais de Aracaju/SE. Dissertação (mestrado em biologia parasitária), **Universidade Federal de Sergipe**, 2020.

GUIMARÃES, E. L. A. M. Conhecimento sobre leishmaniose visceral e prática das medidas de prevenção e controle por proprietários de cães em Belo Horizonte, 2010/2011. Dissertação (mestrado) – **Universidade Federal de Minas Gerais**, Escola de Veterinária. 79 p., 2013.

HERMANSON, G. Preparation of Colloidal Gold-Labeled Proteins. **Bioconjugate Techniques**, pp.924-935, DOI 10.1016/B978-0-12-370501-3.00024-2. 2007.

JAPOLLA, G. et. al. Teste imunocromatográfico de fluxo lateral: uma ferramenta rápida de diagnóstico. **Enciclopédia biosfera**, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v.11 n.22; p. 2015 2635

KAUR, J.; KUMAR, A.; KAUR, J. Strategies for optimization of heterologous protein expression in *E. coli*: Roadblocks and reinforcements. **International Journal of Biological Macromolecules**. Vol. 106, Pages 803-822. January 2018.

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

LÉVY, R. et al. Rational and combinatorial design of peptide capping ligands for gold nanoparticles. **Journal of the American Chemical Society**, v. 126, n. 32, p. 10076-10084, 2004.

LIMA, I. C.; GRISOTTI, M.,. Relação humano-animal e leishmaniose: repercussões no cotidiano de indivíduos inseridos em região endêmica. **Saúde Soc. São Paulo**, v.27, n.4, p.1261-1269, 2018.

MACHADO, Carlos José Saldanha; SILVA, Erica Gaspar e VILANI, Rodrigo Machado. O uso de um instrumento de política de saúde pública controverso: a eutanásia de cães contaminados por leishmaniose no Brasil. **Saude soc.** [online]. 2016, vol.25, n.1, pp.247-258. ISSN 0104-1290. <http://dx.doi.org/10.1590/S0104-12902016146918>.

MAPA, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Coordenação de Fiscalização de Produtos Veterinários (2016). **Nota técnica nº 11/2016/CPV/DFIP/SDA/GM/MAPA**. Processo nº 21000.042544/2016-94.

MILLIPORE, E. M. D. Rapid Lateral Flow Test Strips: Considerations for Product Development. **EMD Millipore Corporation: Billerica, MA, USA**, 2008.

MILLIPORE, E. M. D. Rapid Lateral Flow Test Strips: Considerations for Product Development. **EMD Millipore Corporation: Billerica, MA, USA**, 2015.

MCPHERSON, R. A.; PINCUS, M. R. Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods. 22. ed. Philadelphia, **Elsevier Saunders**. p. 259- 272, 2011.

NASCIMENTO, Camila Tauane Monteiro. Expressão heteróloga de uma osmotina laticífera e desenvolvimento de protocolos para extração da preteína recombinante a partir de corpos de inclusão. 2016. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, **Universidade Federal do Ceará**, Fortaleza, CE, 2016.

NOVAIS, Janaína Tenorio. Estudo de estabilidade de uma proteína recombinante, baseada na Proteína Circumsporozoíta de Plasmodium vivax, candidata a vacina contra malária.2021. Trabalho de Conclusão do Curso (Curso de Farmácia-Bioquímica) Faculdade de Ciências Farmacêuticas, **Universidade de São Paulo**. São Paulo, SP,2021.

NGHIEM, T. H. L. et. al. Synthesis, capping and binding of colloidal gold nanoparticles to proteins. **Adv. Nat. Sci.: Nanosci. Nanotechnol.** 1 (2010) 025009 (5pp) doi:10.1088/2043-6254/1/2/025009. 2010.

OAKLEY, B.R., KIRSCH, D.R., MORRIS, N.R. 1980. A simplified ultrasensitive silver stain for detecting proteins in polyacrylamide gels. **Analytical Biochemistry**, v.105, n.2, p.361-3.

O'FARRELL, B. Lateral flow immunoassay systems: Evolution from the current state of the art to the next generation of highly sensitive, quantitative rapid assays. In: WILD, D. G. (ed.). *The Immunoassay Handbook*. 4. ed. **New York: Elsevier**, 2013. cap. 2,4, p. 89-107.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE – OMS (2020). Ending the neglect to attain the Sustainable Development Goals: a road map for neglected tropical diseases 2021–2030. Geneva: **World Health Organization**; 2020. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.

PERES N.T.A., CUNHA L.C.S., BARBOSA M.L.A, SANTOS M.B., OLIVEIRA F.A., JESUS A.M.R., ALMEIDA R.P. Infection of Human Macrophages by *Leishmania infantum* Is Influenced by Ecto-Nucleotidases. **Sec. Imunomunologia Microbiana, Frente Imunol.**, 11 de janeiro de 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.0195>

QI, X. Sun, Y.; Xiong, S. A single freeze-thawing cycle for highly efficient solubilization of inclusion body proteins and its refolding into bioactive form. **Medical Sciences, Soochow University**, Suzhou, Jiangsu 215123, China. 2015.

RIBEIRO, C. R.; GONÇALVES, C. A.; CRUZ, L. M.; GALERA, P. D. Prevalência da leishmaniose visceral canina e coinfeções em região periurbana no Distrito Federal – Brasil. **Cienc. anim. bras.**, Goiânia, v.20, 1-8, e-49589, 2019.

SAMBROOK J, FRITSCH EF, MANIATIS T, (1989). *Molecular Cloning: A laboratory manual*, second edition. **Cold Spring Harbor Press**, Cold Spring, NY.

SANTOS, M. C. S. Avaliação de testes sorológicos de importância diagnóstica na Leishmaniose Visceral Canina. 2020. 91f. Dissertação (Mestrado em Ciências e Biotecnologia) - **Instituto de Biologia, Universidade Federal Fluminense**, Niterói, 2020.

SILVA, R. B.S., MENDES, R. S., SANTANA, V.L., SOUZA, H.C., RAMOS, C.P.S., SOUZA, A.P., ANDRADE, P.P., MELO, M.A. Aspectos epidemiológicos da leishmaniose visceral canina na zona rural do semiárido paraibano e análise de técnicas de diagnóstico. **Pesq. Vet. Bras**, 2016; v. 36, ed. 7, p. 625-629

SILVA, W. et. al. ENTPDases from Pathogenic Trypanosomatids and Purinergic Signaling: Shedding Light towards Biotechnological Applications. **Bentham Science**, v. 1, p. 213-226, **DOI: 10.2174/1568026620666201005125146**. 2020.

SILVA, R. R.; SILVA, A. S. ; SANTOS, P. L.; CAMPOS, R. N. S. Leishmaniose visceral em cães no Brasil: revisão de literatura. **Revista Science end Animal Health**, V.9, N.1, P. 54-75, JAN/ABR 2021.

SCHNEIDER, C. A.; RASBAND, W. S.; ELICEIRI, K. W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. **Nature Methods**. V. 9, P. 671–675, 2012.

TANG, H.; LIU, H.; CHEN, R.; GAO, Y.; DONG, M.; LING, S.; WANG, R.; WANG, S. Development of Immunochromatographic Strip for Detection of  $\alpha$ B-VxXXIVA-Conotoxin Based on 5E4 Monoclonal Antibody. **Toxins** 2022, 14, 191. <https://doi.org/10.3390/toxins14030191>. 2022.

TEIXEIRA, A. I. P. Cães e tutores: os desafios do diagnóstico e do controle da leishmaniose visceral canina. 2019. 178 f., il. Tese (Doutorado em Medicina Tropical), **Universidade de Brasília**, Brasília, 2019.

TOWBIN, H.T. STAEHETIN, A.; GORDON, J. Eletrophoretic transfer of protein from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Produce and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences, of the United State of America*, v.76,n.9, p.4350-4354, 1979.

VALDEZ-CRUZ NA, CASPETA L, PEREZ NO, RAMIREZ OT, TRUJILLO-ROLDAN MA,. Production of recombinant proteins in E. coli by the heat inducible expression system based on the phage lambda pL and/or pR promoters. **Microb Cell Fact**, (9), pp 18. 2010.

VASCONCELLOS, R. D. S. et al. Leishmania infantum Ecto-Nucleoside Triphosphate Diphosphohydrolase-2 is an Apyrase Involved in Macrophage Infection and Expressed in Infected Dogs. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 11, 2014.

YOU DEN, W.J., STEINER, E.H. Statistical manual of AOAC - Association of Official **Analytical Chemistry**, Washington, DC, 1975.