

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
Bacharelado em Biotecnologia

ISABELA DOS SANTOS BEGNAMI

**PRODUÇÃO E AVALIAÇÃO DE ANTICORPO POLICLONAL ANTI-LEISHMANIA
PARA APLICAÇÃO EM DIAGNÓSTICOS**

São Carlos
2020

Isabela dos Santos Begnami

**PRODUÇÃO E AVALIAÇÃO DE ANTICORPO POLICLONAL ANTI-LEISHMANIA
PARA APLICAÇÃO EM DIAGNÓSTICO**

Trabalho de Conclusão de Curso, apresentado ao curso de Bacharelado em Biotecnologia da Universidade Federal de São Carlos como requisito para a obtenção do título de bacharel em biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Emanuel Carrilho
Co-Orientadora: Profa. Dra. Fernanda de F. Anibal

SÃO CARLOS
2020

PRODUÇÃO E AVALIAÇÃO DE ANTICORPO POLICLONAL ANTI-LEISHMANIA PARA APLICAÇÃO EM DIAGNÓSTICO

RESUMO

A *Leishmania* é um gênero de protozoários com várias espécies de parasitas intracelulares que podem causar as doenças chamadas leishmanioses, divididas em: visceral (LV), a forma mais grave que afeta os órgãos internos e pode levar a óbito, ou cutânea (LC), acometendo a pele ou as mucosas com úlceras. Essas enfermidades entram no grupo de doenças chamadas negligenciadas, pois infectam majoritariamente populações mais pobres e não são prioridade para os serviços de saúde, com seus métodos específicos de tratamento e diagnóstico não chegando aos locais com maior número de casos. Para solucionar o problema e aumentar a especificidade e a sensibilidade, podemos utilizar purificados recombinantes específicos, como a proteína recombinante K39 (kinesin-like protein K39), nos testes. Portanto, o objetivo do trabalho foi produzir anticorpos anti-leishmania a partir K39 visando o desenvolvimento de um teste imunoenzimático. O anticorpo policlonal anti-leishmania foi produzido, avaliado qualitativamente por eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE, transferido para uma membrana de nitrocelulose para um Ensaio de *Immunoblotting* e submetido ao imunoensaio de ELISA indireto para a análise de sensibilidade. No perfil eletroforético foi possível observar a presença de duas bandas, uma de cadeia curta (25kDa) e uma de longa (53kDa), além de uma contaminação por albumina. A amostra de diluição 1:1000 ficou mais forte do que a de 1:5000. Diferentes diluições foram testadas no *Immunoblotting* (1:25, 1:50, 1:100, 1:250 e 1:500) e bandas foram visualizadas em todas, sendo a antigênica de 1:500 a mais evidente, o que confirma a reatividade do anticorpo produzido. Por ser policlonal, bandas inespecíficas também foram constatadas. A densidade óptica do ELISA foi medida em duplicata e padronizada para análise, gerando resultados satisfatórios para as concentrações de 1:5000 e 1:1000, mesmo com este tendo o último resultado menor. Assim, o antígeno K39 obteve valores que possibilitam seu uso em diagnósticos para leishmaniose.

Palavras-chave: leishmaniose, anticorpo, diagnóstico, K39.

PRODUCTION AND EVALUATION OF ANTI-LEISHMANIA POLYCLONAL ANTIBODY FOR DIAGNOSTIC APPLICATION

ABSTRACT

Leishmania is a protozoa genus with several species of intracellular parasites that cause diseases called leishmaniasis, divided into: visceral (VL), the most serious form that affects internal organs and can lead to death, or cutaneous (CL), attacking the skin or mucous membranes with ulcers. These diseases belong to the group of neglected diseases, because they mostly infect poorer populations and are not a priority for health services, with their specific methods of treatment and diagnosis not reaching the places with the highest number of cases. To solve the problem and increase specificity and sensitivity, we can use specific recombinant purifieds, such as the recombinant protein K39 (kinesin-like protein K39), in the tests. Therefore, the objective of the work was to produce anti-leishmania antibodies from K39 aiming at the development of an immunoenzymatic test. The polyclonal anti-leishmania antibody was produced, qualitatively evaluated by SDS-PAGE polyacrylamide gel electrophoresis, transferred to a nitrocellulose membrane for an Immunoblotting Assay and applied to an indirect ELISA immunoassay for sensitivity analysis. In the electrophoretic profile was possible to observe the presence of two bands, one short chain (25kDa) and one long chain (53kDa), in addition to albumin contamination. The 1: 1000 dilution sample was stronger than the 1: 5000 sample. Different dilutions were tested in Immunoblotting (1:25, 1:50, 1: 100, 1: 250 and 1: 500) and bands were seen in all of them, with the 1: 500 antigen being the most evident, which confirms the reactivity of the antibody produced. For being polyclonal, nonspecific bands were also found. The optical density of the ELISA was measured in duplicate and standardized for analysis, generating satisfactory results for the concentrations of 1: 5000 and 1: 1000, even with this having the last lower result. Consequently, the K39 antigen obtained values that enable its use in diagnoses for leishmaniasis.

Key words: leishmaniasis, antibody, diagnostic, K39.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Formas morfológicas de <i>Leishmania spp.</i> (A) Promastigota e (B) Amastigotas.....	08
Figura 2 - Fêmea de flebotomíneo, também conhecido como mosquito-palha.....	09
Figura 3 - Esquema com o ciclo de vida da <i>Leishmania spp.</i>	10
Figura 4 - Mapa de incidência da LV no mundo em 2018 segundo a OMS.....	13
Figura 5 - Mapa de incidência da LC no mundo em 2018 segundo a OMS.....	13
Figura 6 - Esquema de plataforma imunocromatográfica.....	16
Figura 7 - Esquema para produção de anticorpos por inoculação de antígenos.....	17
Figura 8 - Perfil eletroforético da proteína recombinante K39 em gel de SDS-PAGE (15%). Massa Molecular entre 35 a 25 kDa.....	22
Figura 9 - Sequência completa da proteína K39 obtida de <i>Leishmania chagasi</i> (UniProtKB - P46865).....	23
Figura 10 - Perfil eletroforético do anticorpo policlonal anti-K39 em gel de SDS-PAGE (12,5%) nas diluições de 1:5000 e 1:1000.....	25
Figura 11 - Perfil da proteína K39 após transferência do gel para membrana de nitrocelulose corada com reagente Ponceau S. PM: padrão molecular <i>Colorburst</i> (Sigma).....	26
Figura 12 - Detecção da proteína imunogênica por <i>immunoblotting</i> usando o anticorpo policlonal anti-K39 marcado com peroxidase e revelados com DAB (diaminobenzidina).....	27
Figura 13 - Gráfico de absorvância construído a partir dos resultados do teste de ELISA para o anticorpo anti-K39.....	29
Figura 14 - Resultado do teste após a aplicação das suspensões do anticorpo policlonal anti-K39 produzido em camundongo. A) Controle negativo B) Controle positivo.....	30

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Categorias taxonômicas do gênero Leishmania.....	7
Tabela 2 - Média das absorvâncias obtidas com o teste de ELISA a 450nm.....	28

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	7
1.1 Agente causal: <i>Leishmania spp</i> e seu ciclo de vida.....	7
1.2 Leishmaniose: sintomas e sinais.....	10
1.2.1 Leishmaniose cutânea.....	11
1.2.2 Leishmaniose visceral (LV).....	11
1.3 Epidemiologia da doença.....	12
1.4 Metodologia para detecção de Leishmaniose.....	14
1.5 Teste imunocromatográfico.....	15
1.6 Produção de anticorpo.....	16
1.7 Proteína recombinante k39.....	18
2. OBJETIVOS.....	18
2.1 Objetivo geral.....	18
2.2 Objetivos específicos.....	18
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	19
3.1 Escolha dos antígenos e produção dos anticorpos	19
3.2 Análise qualitativa através do perfil eletroforético em gel de SDS-PAGE.....	19
3.3 Análise do anticorpo policlonal anti- <i>Leishmania</i> por Ensaio de <i>Immunoblotting</i>	20
3.4 Imunoensaio ELISA Indireto.....	20
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	22
4.1. Estudo da proteína recombinante K39.....	22
4.2. Análise qualitativa do anticorpo anti-K39 produzido.....	24
4.3. Análise da sensibilidade e especificidade do anticorpo policlonal anti- <i>leishmania</i> produzido.....	25
4.3.1. Avaliação por <i>Immunoblotting</i>	25
4.3.2. Teste Imunoenzimático ELISA.....	27
4.3.3. Teste Imunocromatográfico.....	29
5. CONCLUSÃO.....	31
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	32

1. INTRODUÇÃO

1.1. Agente causal: *Leishmania* spp e seu ciclo de vida.

O gênero *Leishmania* (Tabela 1) é composto por diversas espécies de protozoários parasitas intracelulares obrigatórios da família Trypanosomatidae (LEVINE *et al.*, 1980).

Tabela 1. Categorias taxonômicas do gênero *Leishmania*.

Categoria taxonômica	Nomenclatura
Reino	Protista
Filo	Sarcomastigophora
Ordem	Kinetoplastida
Família	Trypanosomatidae
Gênero	<i>Leishmania</i>

Fonte: autoral com informações de LEVINE *et al.*, 1980.

Esses protozoários são agentes etiológicos de doenças denominadas Leishmanioses, que infectam diversos mamíferos, inclusive o homem. Dentre as espécies que podem causar enfermidades destacam-se, uma com caráter antroponótico: *L. donovani*, presente em países da Ásia como Bangladesh, China e Índia; e duas com zoonótico: *L. infantum*, encontrada na Ásia Central, norte da África e Europa Mediterrânea, e *L. chagasi*, comum das Américas (NOGUEIRA, 2014).

Devido ao ciclo de vida complexo e para melhor se adaptarem ao hospedeiro, esses parasitas apresentam dois estágios de desenvolvimento: a forma amastigota, presente hospedeiro vertebrado definitivo, e a promastigota, no hospedeiro vetor invertebrado (Figura 1) (NEVES, 2005; BESTEIRO *et al.*, 2007).

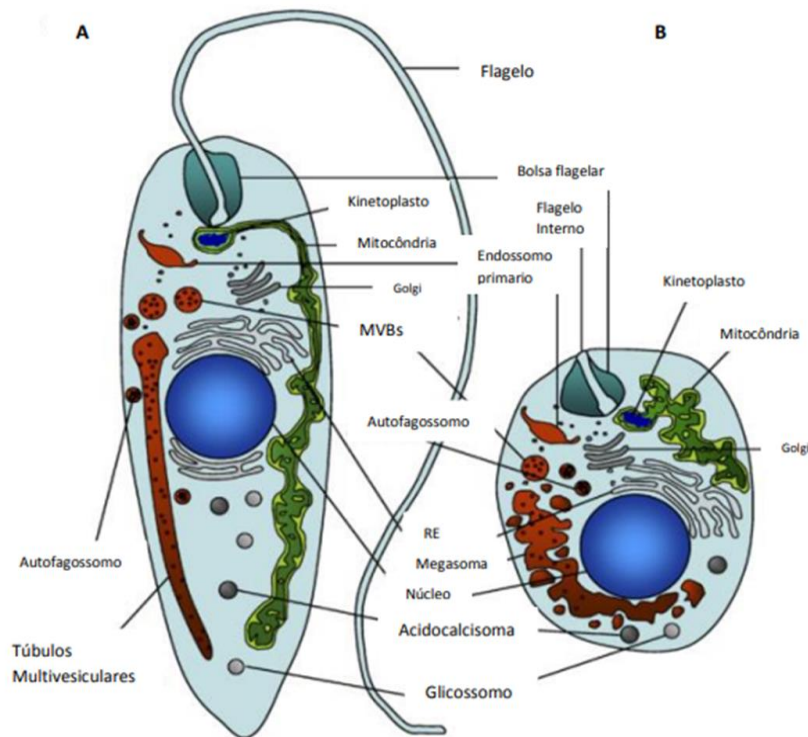


Figura 1 - Formas morfológicas de *Leishmania* spp. (A) Promastigota e (B) Amastigotas.

Fonte: Descrito por JARAMILLO (2014) adaptado de BESTEIRO *et al.* (2007).

A estrutura arredondada ou ovalada, não apresenta flagelos e infecta o sistema linfomonocitário do hospedeiro vertebrado. Alojada nos fagossomos dos monócitos, histiócitos e macrófagos, se multiplicam por divisão assexuada até conseguirem romper a célula, disseminando-se e iniciando uma reação inflamatória (Figura 1B) (GONTIJO e CARVALHO, 2003). Quando o vetor suga os parasitas, estes se alojam no intestino e se transformam nas formas promastigotas. Estas são alongadas, apresentam um longo flagelo e se multiplicam no sistema digestivo até migrarem para o proboscídeo do inseto e conseguirem ser transmitidas aos hospedeiros pela saliva (Figura 1A) (BASANO e CAMARGO, 2004).

A transmissão ocorre, geralmente, por meio das fêmeas hematófagas das espécies de flebotomíneos, que pertencem à subfamília Phlebotominae (Figura 2). Podemos destacar dois principais gêneros: o *Phlebotomus*, originário da África, Ásia e Europa, e o *Lutzomyia*, encontrado nas Américas (GRAMICCIA e GRADONI, 2005).



Figura 2 - Fêmea de flebotomíneo, também conhecido como mosquito-palha.

Fonte: Arquivos do INSTITUTO OSWALDO CRUZ, 2018. (Disponível em <http://www.fiocruz.br>)

Popularmente conhecido como mosquito-palha ou birigui, essas espécies de vetores são encontradas principalmente em florestas, podendo ou não ser endêmicas de regiões de deserto e outras vivendo perto de residências urbanas e áreas rurais (LAINSON e SHAW, 1987). São pequenos insetos amplamente distribuídos nos climas quentes, com comprimentos entre 1,5 a 3 mm, olhos grandes, muito pilosos e de cor palha, são reconhecidos por pousarem com as asas permanecendo entreabertas e ligeiramente levantadas (COELHO, 2010).

O ciclo de vida da *Leishmania* desenvolve-se quando a fêmea de um flebotomíneo inocula formas promastigotas no hospedeiro vertebrado junto com a saliva durante o repasto sanguíneo e esses parasitas são fagocitados pelos macrófagos residentes ou pelos neutrófilos recrutados a partir da picada do inseto. No interior do fagolisossomo, ocorre a transformação em formas amastigotas de tamanho reduzido, que se reproduzem por divisão binária até que a célula infectada sofra lise para alcançar mais células fagocíticas (NADERER e MCCONVILLE, 2008). Quando outro inseto vetor for se alimentar do hospedeiro infectado, os protozoários serão ingeridos junto com o sangue e se instalarão no seu intestino, sofrendo uma nova diferenciação em formas promastigotas chamadas procíclicas, que são menos infectantes. Elas se transformam em promastigotas metacíclicas, altamente infectantes, que migram ao probóscide do inseto e, ao efetuar novo repasto, contamina outro hospedeiro vertebrado fechando o ciclo (Figura 3) (ARRUDA, 2013).

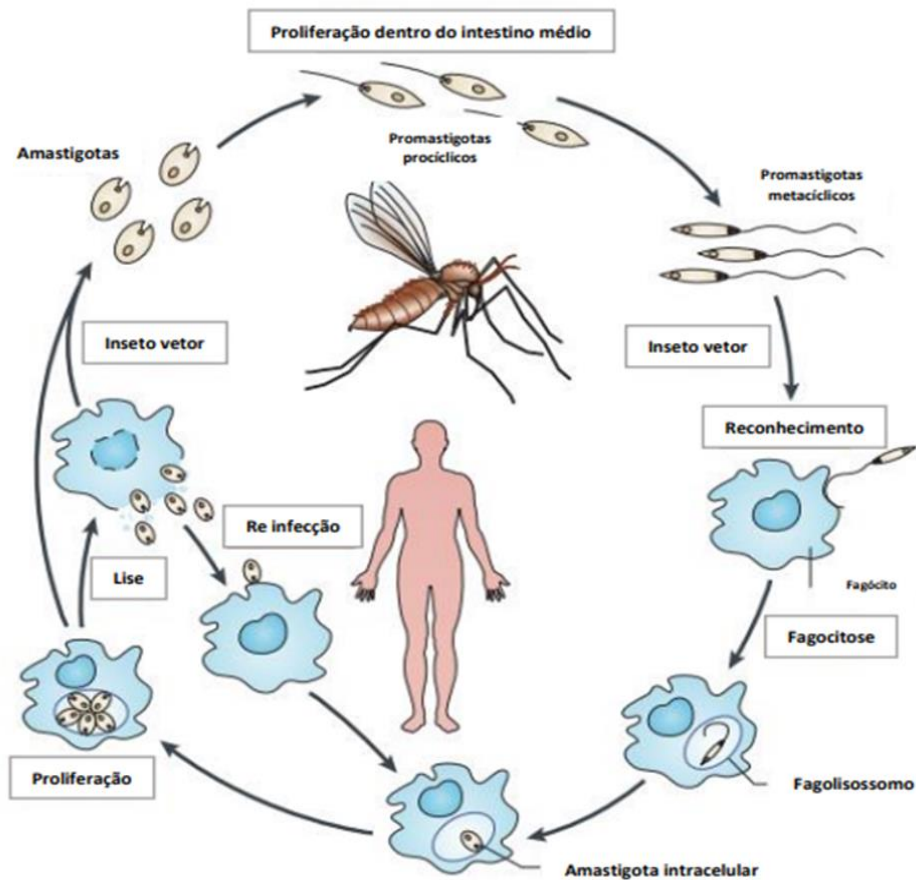


Figura 3 - Esquema com o ciclo de vida da *Leishmania* spp.

Fonte: Descrito por JARAMILLO (2014) adaptado de KAYE & SCOTT (2011).

1.2. Leishmanioses: sinais e sintomas

As leishmanioses são uma classe de doenças causadas pelas espécies de protozoário do gênero *Leishmania* que podem apresentar diferentes formas clínicas: a leishmaniose cutânea que pode ser tegumentar (LC) ou mucocutânea (LMC) e a leishmaniose visceral (LV), conhecida também como calazar. As diferenças são resultantes de propriedades do parasita como patogenicidade, virulência e por fatores do hospedeiro (NOGUEIRA, 2014).

1.2.1. Leishmaniose cutânea

O termo leishmaniose cutânea é utilizado para se referir às leishmanioses tegumentares (LC) e às leishmanioses mucocutâneas (LMC). Pertencentes a um tipo de infecção não contagiosa e de evolução crônica causada por várias espécies do gênero *Leishmania*, que acometem as estruturas cartilaginosas da nasofaringe e da pele (NEVES, 2005).

A LC é a forma mais frequente entre todas as leishmanioses, cujos sintomas consistem na formação de uma úlcera na pele com bordas elevadas e um centro necrótico. A recuperação da LC é frequente, com a formação de imunidade de longa duração após o seu contágio. No Brasil, a maioria dos casos se deve a espécie *L. braziliensis*, com alguns casos provenientes da *L. amazonensis* (VIEIRA-GONÇALVES et al., 2008).

Já as LMC, apresentam as úlceras nos tecidos de mucosa, tendo como um dos sintomas mais comuns a obstrução ou o sangramento nasal (LESSA et al., 2007). Estudos têm demonstrado uma associação do agravamento da doença mucocutânea, pela presença de grandes lesões cutâneas acima da altura pélvica, com a aplicação de um tratamento inadequado (LLANOS-CUENTAS et al., 1984).

1.2.2. Leishmaniose visceral (LV)

A LV é uma doença sistêmica grave, caracterizada por febre irregular de longa duração, perda de peso, anemia com leucopenia, inchaço de órgãos como fígado e baço, edema e estado de debilidade progressiva (ALVARENGA et al., 2010). A falta ou a ineficiência de um tratamento pode evoluir ao óbito em mais de 90% dos casos (NEVES, 2005).

Apesar de estudos relacionados às respostas imunológicas do hospedeiro e à genética da *Leishmania*, ainda não se tem conhecimento sobre os elementos que controlam a formação da doença visceral (MCCALL et al., 2013). Entretanto, é possível observar uma maior resistência, às elevadas temperaturas resultantes da febre, e aos oxidantes produzidos pelos fagócitos, por parte das espécies do parasita que causam a LV (SARKAR et al., 2012).

Ainda, uma LV semelhante a humana foi observada em cães. Também conhecida como Calazar, é considerada uma doença crônica e fatal, produzida pelo

agente etiológico *Leishmania chagasi* e transmitida através da picada do inseto hematófago flebotomíneo *Lutzomyia longipalpis*. Frequente entre os cães tem seu quadro clínico semelhante ao do humano, com a adição de lesões na pele junto do acometimento das vísceras (KRAUSPENHAR *et al*, 2007). Além disso, o animal pode ser considerado um importante reservatório do protozoário, permanecendo assintomática por longos períodos de tempo e, assim, se tornando a principal fonte de infecção para os insetos vetores e sendo responsável pelo caráter endêmico-epidêmico da doença (PALATNIK-DE-SOUSA *et al.*, 2001).

1.3. Epidemiologia da doença

Atualmente, mais de 1 bilhão de pessoas vivem nas áreas endêmicas da doença correndo risco de infecção. Anualmente é estimado mais de 1 milhão de novos casos de LC em comparação com aproximadamente 30.000 novos casos de LV, sendo esta última doença reconhecida pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como uma das sete endemias mundiais de prioridade absoluta (OMS, 2018).

De acordo com dados disponibilizados pela OMS, a maioria dos casos de Leishmaniose visceral (LV) foi registrado em Bangladesh, Brasil, Índia, Nepal e Sudão, observados na Figura 4. Para a Leishmaniose cutânea (LC), estudos verificaram a ocorrência no Afeganistão, Arábia Saudita, Brasil, Irã, Peru e Síria (Figura 5) e 90% dos casos de Leishmanioses mucocutâneas (LMC) ocorreram na Bolívia, Brasil e Peru (RATH *et al.*, 2003). Assim, a leishmaniose pode ser considerada uma doença negligenciada, ou seja, uma enfermidade que afeta predominantemente as populações mais pobres e, por isso, não são prioridades para os serviços de saúde, contribuindo para a perpetuação da desigualdade e exclusão social (WERNECK *et al.*, 2011).

No Brasil, as ocorrências de leishmanioses vêm se espalhando pelo território. A Leishmaniose tegumentar (LC), por exemplo, foi detectada em 19 estados na década de 1980, porém em 2003 foram registrados casos autóctones em todos os estados brasileiros (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017). Ou seja, a doença vem se propagando rapidamente devido, provavelmente, às interferências nos ecossistemas, além de não ser umas das prioridades dos setores de saúde, sejam eles públicos ou privados (MARTINS e LIMA, 2013).

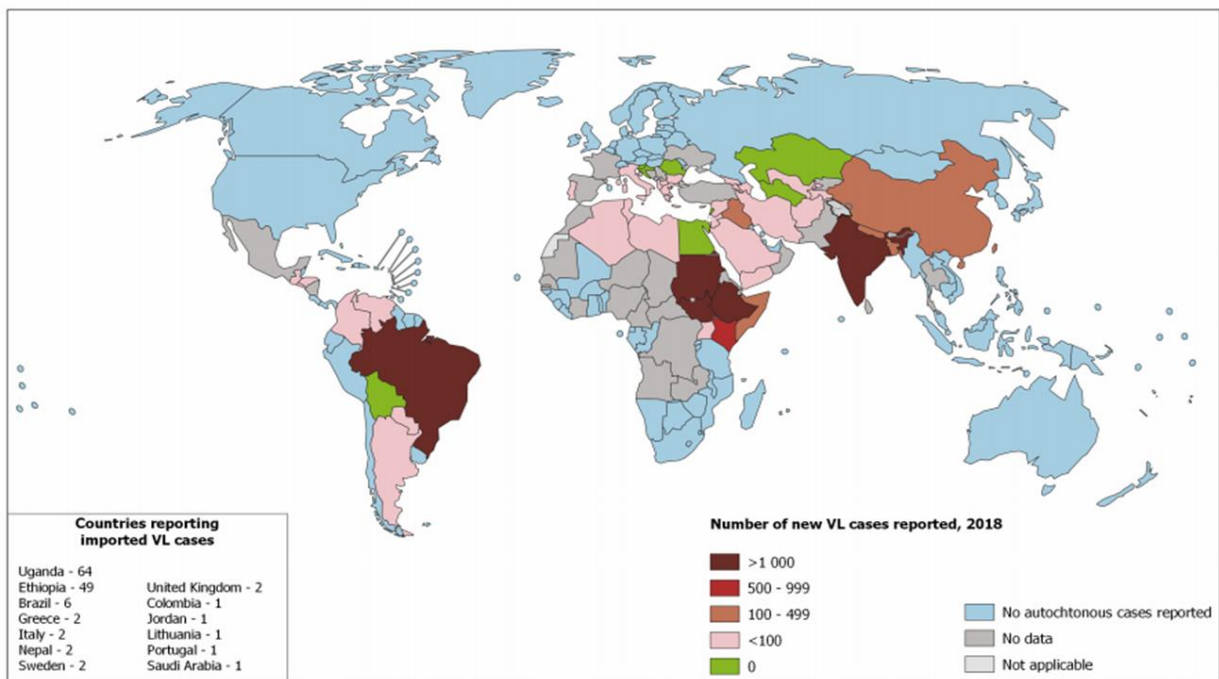


Figura 4 - Mapa de incidência da LV no mundo em 2018 segundo a OMS.

Fonte: OMS, 2018. Disponível em: who.int/docs/default-source/ntds/leishmaniasis

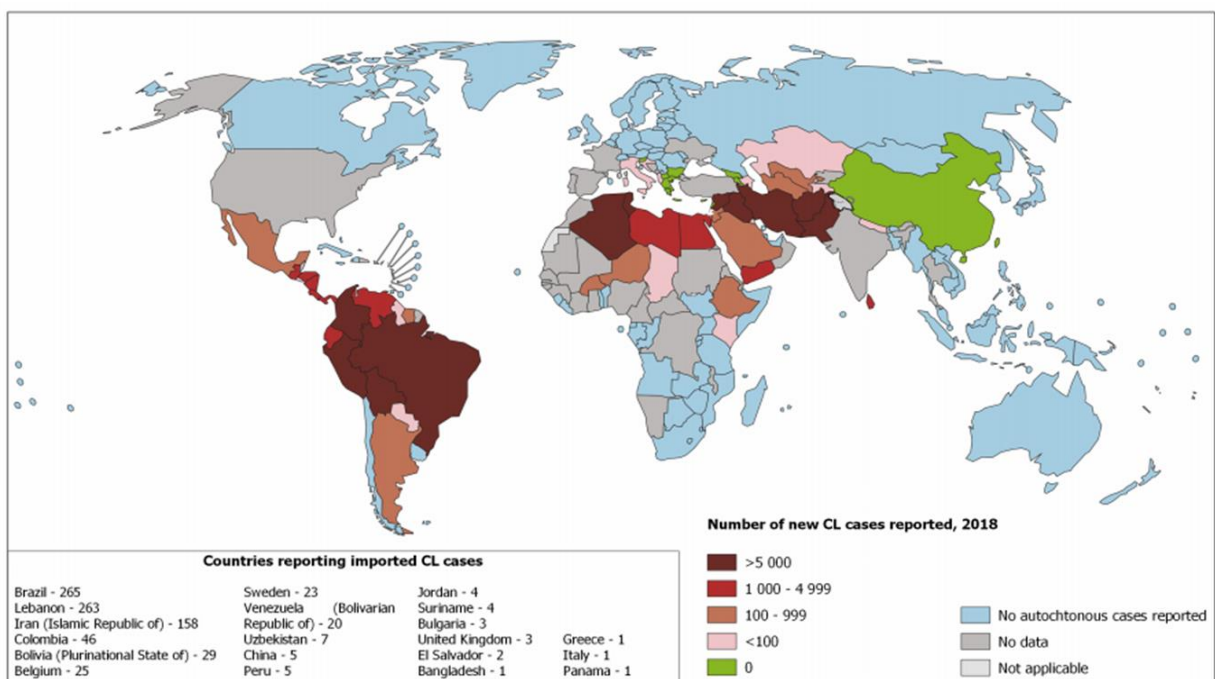


Figura 5 - Mapa de incidência da LC no mundo em 2018 segundo a OMS.

Fonte: OMS, 2018. Disponível em: who.int/docs/default-source/ntds/leishmaniasis

1.4. Metodologias para detecção de Leishmaniose

A Leishmaniose, por ser uma doença considerada negligenciada, apresenta seus métodos específicos de tratamento e diagnóstico restritos a população, principalmente as que não têm acesso aos recursos necessários. Ressalta-se ainda que, para essa doença, o diagnóstico precoce é de grande importância, visto que pode evitar o desenvolvimento de infecções mais severas, o agravamento da doença, levando o paciente a morte (VAISH *et al.*, 2012).

Os diagnósticos geralmente se dão, a princípio, pelas análises clínicas e epidemiológicas visando identificar os principais sinais da enfermidade. No caso das leishmanioses, as análises sintomáticas coincidem com diversas outras patologias e, portanto, são inconclusivas para a confirmação da infecção. Assim, os testes laboratoriais se fazem necessários, podendo ser de identificação do parasita; de detecção da resposta imunológica, como a produção de anticorpos específicos e reações celulares, ou ainda moleculares (SCHUBACH, 2011).

Os testes parasitológicos, baseados no cultivo das formas amastigotas do parasita a partir do esfregaço de órgãos como fígado ou baço, é um dos métodos de referência de diagnóstico de leishmanioses devido à alta especificidade. Porém, é um exame invasivo, de resultado demorado e com sensibilidade moderada (GUERIN *et al.*, 2002). Como nem sempre é possível encontrar e isolar os parasitas, a expressiva resposta imunológica humoral da doença tem permitido aos testes sorológicos seu uso, mesmo com uma especificidade não tão elevada.

Em relação aos imunoenaios, um método sorológico muito aplicado é o de imunoenzimático (ELISA) que utiliza diversos tipos de antígenos crus ou purificados para detecção da enfermidade, mas que ainda tem problemas de especificidade (SUNDAR e RAI, 2002). Outro teste, a reação de imunofluorescência indireta (RIFI) é o diagnóstico disponibilizado pelo Sistema Único de Saúde (SUS) e, geralmente, consiste no uso de formas promastigotas como antígenos, o que pode gerar reações cruzadas em razão da baixa especificidade (ASSIS *et al.*, 2008; LUCIANO *et al.*, 2009). Por outro lado, o conhecimento de técnicas de biologia molecular, foi importante para desenvolver diagnósticos baseados na detecção dos ácidos nucleicos (DNA ou RNA) da *Leishmania* presente em amostras biológicas, como sangue ou aspirado da medula, a partir da técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR). Método extremamente sensível e específico, porém de realização

complexa e alto custo, vem sendo mais aplicado para estudos epidemiológicos do que para o diagnóstico de rotina (DOURADO *et al.*, 2007).

1.5. Teste imunocromatográfico

Uma outra técnica que vem ganhando destaque na área dos diagnósticos é a imunocromatografia, que tem se mostrado uma boa opção para aplicação em diversas doenças. O teste imunocromatográfico tem vantagens que permitem sua utilização para doenças negligenciadas como: o baixo custo operacional e de produção, a necessidade de uma menor quantidade de amostra biológica, a facilidade de produção em larga escala e com maior prazo de validade, além de ser rápido, apresentando o resultado em até 30 minutos (JAPOLLA *et al.*, 2015).

O teste rápido é composto por membranas superpostas, cada qual com uma função, sobre um suporte plástico (Figura 6) sendo os principais componentes estruturais de um teste de fluxo lateral as seguintes regiões: o filtro de amostra que recebe a amostra biológica como sangue, urina, saliva ou outros fluidos, o suporte do conjugado que contem nanopartículas de ouro ou látex e o antígeno ou anticorpo imobilizado, uma membrana de nitrocelulose e um filtro de absorção (SHAN *et al.*, 2015).

O filtro de amostra é feito de celulose ou fibra de vidro e é tratado para ser compatível com o restante do teste, a amostra migra para o suporte do conjugado e seu analito interage com o conjugado de nanopartículas e anticorpo/antígeno presente. Esse complexo formado corre pela membrana de nitrocelulose e continua interagindo até atingir a linha teste formada por anticorpos ou antígenos, que vai capturar o analito-conjugado. O excesso de amostra é absorvido pelo filtro final, que impede que a amostra retorne às linhas testes e resulte em resultados falsos positivos, por exemplo (JAPOLLA *et al.*, 2015).

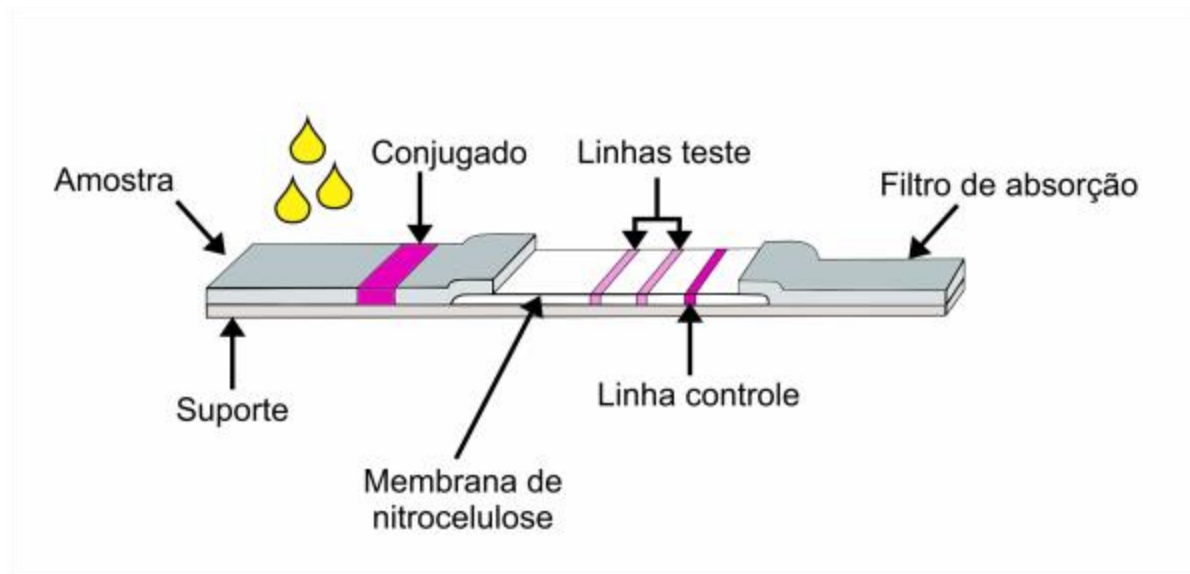


Figura 6 - Esquema de plataforma imunocromatográfica.

Fonte: labtest.com.br

Mesmo apresentando algumas dificuldades relacionadas à tecnologia de produção, infraestrutura e limitações de desempenho por falta de sensibilidade e reprodutibilidade (MILLIPORE, 2013), esse tipo de teste de diagnóstico rápido já vem sendo desenvolvidos com sucesso para algumas outras doenças, como por exemplo malária (FIGUEIREDO FILHO *et al.*, 2003) e dengue (MACHADO *et al.*, 2013).

1.6. Produção de anticorpos

Os anticorpos são moléculas glicoprotéicas, produzidas pelas células B e pelos plasmócitos, que circulam através do sangue e da linfa. Eles têm uma conformação específica que permite o reconhecimento e a inativação de substâncias estranhas ao organismo, os antígenos, que podem ser bactérias, vírus, protozoários ou até mesmo células tumorais (ABBAS *et al.*, 2015). Essas moléculas, também chamadas de imunoglobulinas, podem ser divididas em: i) monoclonais, quando produzidas por um único linfócito B parental, sendo idênticas em relação às propriedades biológicas e físico-químicas, ou ii) policlonais, que são utilizados para uma diversidade de antígenos ou para diferentes partes de um (TROIANO, 2009).

O processo de formação de anticorpos, que ocorre no organismo, é extremamente específico dependendo da resposta imunológica necessária. A

presença de determinado antígeno, resulta na produção de moléculas de alta afinidade, capazes de distinguir espécies de moléculas semelhantes (MARQUES, 2005).

Para produzir um anticorpo em laboratório (Figura 7), é necessário primeiramente definir o antígeno que se planeja combater para, então, escolher a melhor dosagem e a via de inoculação adequada de acordo com o modelo animal a ser utilizado. Assim, injetam-se os antígenos selecionados, por 2 ou 3 vezes no animal com intervalos de 14 dias entre as inoculações, que depois é sangrado. A partir do soro são encontrados os anticorpos produzidos do que foi aplicado. As imunoglobulinas geradas são uma mistura heterogênea que podem ser específicas para diferentes antígenos, ou seja, anticorpos policlonais (ROQUE *et al.*, 2004).

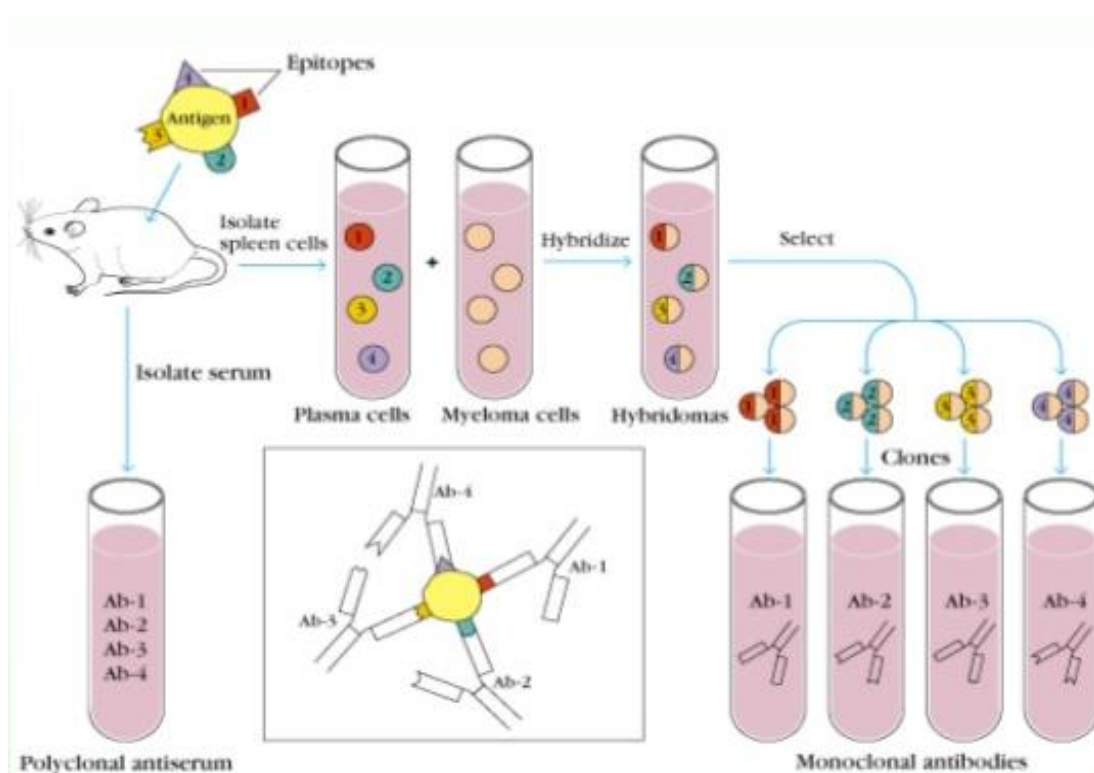


Figura 7 - Esquema para produção de anticorpos por inoculação de antígenos.

Fonte: Kuby *et al.*, 2008.

1.7. Proteína recombinante K39

A maior desvantagem dos métodos de sorologia é a baixa especificidade, que sofrem pelas reatividades cruzadas e pela persistência dos anticorpos mesmo após a cura. No caso da *Leishmania*, para solucionar essa questão, antígenos purificados sintéticos ou recombinantes específicos do gênero vêm sendo empregados, sendo possível destacar a proteína recombinante K39 (rK39) (DOURADO *et al.*, 2007).

A K39 é uma cinesina relacionada às proteínas de genes codificadores que foi identificada nas espécies de *Leishmania*. Ela consiste de uma codificadora sequência gênica de 117 pb, com 39 resíduos de aminoácidos conservados em C-terminal e se mostrou altamente sensível e específica para diagnósticos. A clonagem do antígeno K39 tem resultado na produção do antígeno recombinante rK39 (KUMAR *et al.*, 2001). Alguns estudos confirmam a alta sensibilidade e especificidade da K39 quando utilizada para métodos de diagnóstico de leishmaniose visceral nos países com maior quantidade de casos e mortes, como Brasil, China, Paquistão e Sudão (BURNS *et al.*, 1993; VIANA, 1999; LEMOS *et al.*, 2003).

2. OBJETIVOS

2.2 Objetivo Geral

O objetivo geral do trabalho foi testar e avaliar o anticorpo policlonal anti-leishmaniose desenvolvido para possível aplicação em testes sorológicos imunoenzimáticos.

2.3 Objetivos Específicos

Como objetivos específicos foram:

a) Analisar a integridade e a sensibilidade do anticorpo desenvolvido, obtido de estudos prévios;

- b) Detectar a presença dos anticorpos a partir por separação de proteínas por pesos moleculares;
- c) Avaliar a possibilidade de aplicação do antígeno recombinante k39, bem como do anticorpo policlonal em testes de diagnóstico.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Escolha do antígeno e produção dos anticorpos

O antígeno foi escolhido a partir da identificação de uma molécula comum às espécies do gênero *Leishmania*, que pudesse gerar uma resposta imunológica para os patógenos de interesse. Então, para diminuir os custos e o tempo necessário para isolamento e purificação, foi adquirido o antígeno recombinante K39 de *Leishmania infantum* da empresa Rekom Biotech S.L.

A produção do anticorpo foi feita em estudo prévio (KHOURI, 2018), com a aplicação do antígeno intraperitoneal em camundongos da linhagem Balb/c, provindos Biotério da Faculdade de Ciências Farmacêutica de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FCFRP–USP), com idades entre 4 e 6 semanas e sendo livres de patógenos (SPF - Specific Pathogen Free). A primeira aplicação foi feita para gerar uma resposta imunológica primária, e após 15 dias, foi feita uma segunda aplicação para ser gerada uma resposta imunológica secundária.

Após mais 15 dias, os animais foram eutanasiados e sangrados, sendo o sangue coagulado e centrifugado por 15 min a 1500 rpm para que ocorresse a separação do soro que foi utilizado. Esse soro foi armazenado por cerca de um ano e utilizado para os seguintes experimentos.

3.2 Análise qualitativa através do perfil eletroforético em gel de SDS-PAGE

O anticorpo policlonal produzido foi avaliado por eletroforese em gel de poli-acrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio, SDS-PAGE, sob condições redutoras, utilizando sistema tampão descontínuo de LAEMMLI (1970) e STUDIER

(1973). A separação dos componentes foi efetuada em gel de corrida a 12,5% e em gel de empilhamento a 5% de poliacrilamida. O gel foi preparado a partir de uma solução estoque contendo 30% por peso de acrilamida e 0,8% por peso de bis-acrilamida. No gel de separação a polimerização foi feita em solução contendo 1,5 M de Tris - ácido clorídrico (HCl), pH 8.8 e 0,4% de SDS, em presença de 0,1% v/v de N,N,N',N'-tetrametil-etilenodiamina (TEMED) e 0,1% de persulfato de amônio (APS). O gel de empilhamento foi polimerizado na presença de 0,5 M de Tris - HCl pH 6.8 e 0,4% de SDS, 0,1% de persulfato de amônio e 0,05 % v/v de TEMED. Para o preparo da amostra foram utilizados 64 µL de antígeno diluído em tampão de amostra (1:5), que consistiu de 62,5 mM de Tris - HCl [tris (hidroxi-metil) aminometano] pH 6.8, 2% de SDS, 10% de glicerol, 0,5 M de ditioneitol e 0,002% de azul de bromofenol. As proteínas foram dissociadas pelo aquecimento da amostra em água em ebulição por 3 min. Paralelamente a amostra, em cada corrida eletroforética, uma mistura de proteínas de peso molecular conhecido foi utilizada, como fosforilase b (94 kDa), albumina bovina (67 kDa), ovoalbumina (43 kDa), anidrase carbônica (30 kDa), inibidor de tripsina (20 kDa) e lacto-albumina (14 kDa). A partir da análise da migração destes padrões, os pesos moleculares das proteínas antigênicas foram calculados. A corrida eletroforética foi realizada a 10 mA (80 V) até que o corante penetrasse no gel de separação e, a 20 mA (120 V) até que atingisse o fim do gel. O tampão de corrida foi constituído de Tris 0,075 M, glicina 0,57 M e SDS 0,1%, pH 8.3. A coloração dos géis foi realizada com Coomassie Brilliant Blue. Após a corrida eletroforética uma solução de ácido acético a 10% e etanol a 40% em água, por 30 min, foi utilizada para a fixação do gel. A seguir, foi feita uma lavagem de 3 min com solução de 20% de etanol (v/v) e 5% de ácido acético (v/v) em água. Adicionou-se, então, uma solução de coloração composta por 0,02% de Coomassie Blue (m/v) e 40% de metanol (v/v) em água, sendo deixado por 90 minutos. A seguir esta solução foi retirada e o gel lavado duas vezes, primeiramente por 15 min e, em seguida, por 45 min, com 20% de etanol (v/v) e 5% de ácido acético (v/v) em água.

3.3 Análise do anticorpo policlonal anti-Leishmania por Ensaio de Immunoblotting.

A proteína K39 foi submetida à SDS-PAGE e transferida eletroforéticamente do gel para membrana de nitrocelulose conforme descrito por TOWBIN *et al.* (1979). A partir da produção do anticorpo policlonal, foram feitos dois géis de poli-acrilamida 12,5%. Nas canaletas aplicou-se o padrão de massa molecular Colorburst (Sigma Aldrich), 15 µL de solução de proteína K39 e 10 µL de tampão de amostra (10% glicerol, 5% β-mercaptoetanol, 2,3% de SDS e 0,0625 mol L⁻¹ de Tris-HCl). Os géis foram submetidos à corrente constante de 20 mA por 15 min e 30 mA até o final da corrida. Após a separação eletroforética iniciou-se a eletrotransferência. Utilizou-se membrana de nitrocelulose Amersham Protran Premium 0,45 µm NC (GE Healthcare). O sistema foi montado e submetido à diferença de potencial de 150 V, à uma corrente constante de 400 mA por 4 h. Finalizada a transferência, as membranas de nitrocelulose foram coradas com 0,1% (m/v) de Ponceau S em 5% (v/v) de ácido acético em água.

As membranas de nitrocelulose contendo o extrato proteico foram cortadas em tiras e imersas em água deionizada para remover o corante Ponceau S. Com o intuito de minimizar as ligações inespecíficas das proteínas na membrana, essas foram incubadas com 2 mL de solução bloqueadora 5% de leite desnatado em pó em PBST [PBS 1x acrescido de 0,05% (v/v) Tween-20] por 4 h a temperatura ambiente. Essas tiras foram lavadas 3 vezes com PBST por 5 min. Posteriormente, as tiras foram incubadas com anticorpo policlonal anti-Leishmania produzido em camundongo em diferentes diluições. Todas as diluições foram feitas em solução bloqueadora 1% de leite desnatado em pó em tampão PBST e incubadas em geladeira por 16 h. Em seguida, foram realizadas 3 lavagens por 5 min com solução PBST para retirada do excesso do soro. Finalmente, foi feita uma etapa de incubação de 2 h a temperatura ambiente com os anticorpos anti-IgG de camundongo em cabra (Sigma) respectivamente, conjugado com peroxidase, diluído na proporção 1:5000 em PBST. O excesso de anti-IgG foi retirado com 3 ciclos de lavagem com 2 mL de solução PBST em cada tira. Em seguida, as tiras foram reveladas para evidenciar os complexos antígeno-anticorpo formados com o substrato cromogênico, consistindo de 0,012 g de diamino benzidina (DAB-Sigma) diluído em 20 mL de PBS 1x acrescido de 200 mL de água oxigenada (30% v/v). Após o aparecimento das bandas, a reação foi interrompida com água deionizada.

3.4 Imunoensaio ELISA Indireto

Uma placa de ELISA (Nunc, Thermo Fisher Scientific) de 96 poços foi sensibilizada, cada amostra em duplicata, com 100 µL de Tampão Tris-HCl 0,01 mol.L⁻¹ (pH 7,4) para o branco, 100 µL da proteína K39 em diferentes diluições, e mantido a 4°C durante 16 h. A placa foi lavada três vezes com 200 µL de PBS-T [Tampão PBS 1X contendo 0,05% de Tween-20 (v/v), pH 7,4]. Em seguida, 200 µL de solução de bloqueio (PBS-T contendo 1 % de leite desnatado em pó), foram adicionados aos poços, mantidas por 1 h a 37°C. Três novos ciclos de lavagens foram realizados com 200 µL de PBS-T. Em seguida, adicionou-se 100 µL do anticorpo policlonal anti-K39 produzido em camundongo (Sigma Aldrich) em PBS, e incubado por 3 h a 37°C. A placa foi lavada três vezes pela adição de 200 µL de PBS-T. Posteriormente, adicionou-se 100 µL do anticorpo secundário com peroxidase (anti-IgG de camundongo produzido em cabra) (Sigma Adrich) a uma diluição de 1:10.000 em PBS, sendo incubado por 1 h a 37°C. Decorrido este tempo, a placa foi lavada três vezes pela adição de 200 µL de PBS-T. Após a lavagem, 100 µL do substrato TMB (KPL) foram adicionados aos poços e mantidos por 10 min à temperatura ambiente. Por fim, acrescentou-se 50 µL de Stop Solution (18,5 % de HCl v/v). A leitura das absorbâncias foi feita em um leitor de microplacas a 450 nm.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Estudo da proteína recombinante K39

A proteína recombinante K39 foi obtida comercialmente da Empresa Rekom. Oriunda da *Leishmania infantum* ou *L. chagasi*, foi preparada com a inclusão de uma cauda de histidina ou his-tag e sua integridade pode ser observada pelo perfil de eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS 15% (SDS-PAGE) (Figura 8). O perfil eletroforético da proteína recombinante, expressa em sistema *E. coli*, mostrou uma banda entre 35 e 25 kDa, mostrando uma pureza maior de 98%, segundo dados do fabricante.

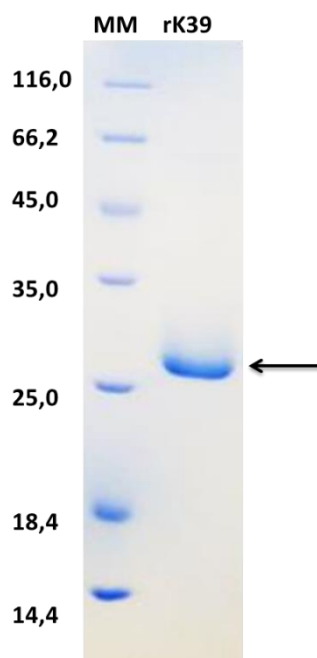


Figura 8 - Perfil eletroforético da proteína recombinante K39 em gel de SDS-PAGE (15%). Massa Molecular entre 35 a 25 kDa.

Fonte: Rekom Biotech

O código genético da *L. chagasi* referente a expressão de uma parte da K39 está depositado no GenBank L07879 apresentando um total de 3319 pb. O GenBank é um banco de dados de anotações de sequências de nucleotídeos e de proteínas mantido pelo “National Center for Biotechnology Information” (NCBI). A sequência completa da proteína K39 de 955 aminoácidos (GenBank: AAA29254.1) apresenta uma massa molecular de 106,168 kDa (Figura 9).


```

1 mhpstvrrea ervkvsrvvr plnerennap egtkvtvaak qaaavvtvkv lggsnnskaa
61 esmgtarrva qdfqfdhvw svetpdacga tpatqadvfr tigyplvqha fdgfnscifa
121 ygqtgsgkty tmmgadvsal sgegngvtp ricleifarka sveaqghsrw ivelgyvevy
181 nervsdllgk rkkgvkggge evyvdvrehp srgvflegqr lvevgslddv vrlieingv
241 rhtastkmnd rssrshaiim lllreertmt tksgetirta gkssrmlvd lagservaqs
301 qvegqqfkea thinlslttl grvidvladm atkgakaqys vapfrdsklt filkdslggn
361 sktfmiatvs psalnyeetl stlryasar divnvaqvne dprarrirel eqmedmrqa
421 maggdpayvs elkkklalle seaqkraadl qalererehn qvqerllrat eaekselesr
481 aalqeemta trrqadkmqa lnrlrkeeqa rkerellkem akkdaalskv rrrkdaeias
541 ereklestva qlereqrere valdalqthq rklqealess ertaaerdql lqqltelqse
601 rtqlsqvvd rrltrdlqr iqyeygetel ardvalcaa emearyhaav fhqltllela
661 tewedalrer alaerdeaaa aeldaaasts qnaresacer ltsleqqre seeraaelas
721 qleataaaks saeqdrentr atleqqres earaaelasq leataaakms aeqdrentra
781 tleqqldse eraaelasql esttaakmsa eqdrestrat leqqldsee naaelasql
841 sttaakmsae qdrestratl eqqlreaser aaelasqls ttaakmsaeq drestratle
901 qlrdseera aelasqlat aaakssaeqd rentraaleq qlrdseeraa elasq

```

Figura 9 - Sequência completa da proteína K39 obtida de *Leishmania chagasi*

(UniProtKB - P46865).

Fonte: GenBank (NCBI).

4.2. Análise qualitativa do anticorpo anti-K39 produzido.

A integridade e a pureza dos anticorpos foram analisadas a partir da eletroforese em gel de dodecil sulfato de sódio poliacrilamida 12,5% (SDS-PAGE). Foi possível observar a presença de duas bandas, uma de 25 e outra de 53 kDa referentes a cadeia curta e longa, respectivamente (Figura 10). A amostra de diluição 1:1000 está mais forte quando comparada a diluição de 1:5000, sugerindo um melhor padrão para ser empregado nos análises posteriores.

Ainda, nota-se que as amostras dos anticorpos apresentaram traços de contaminantes, como a presença da albumina, oriundos da não purificação do anticorpo. O detergente natural se liga a proteína de forma proporcional à massa molecular, a desnaturando pela quebra de ligações não covalentes e separando suas cadeias leve e pesada. No caso, a eficiência da purificação é determinada pela diminuição dos traços de albumina presentes na porção em torno de 66 kDa.

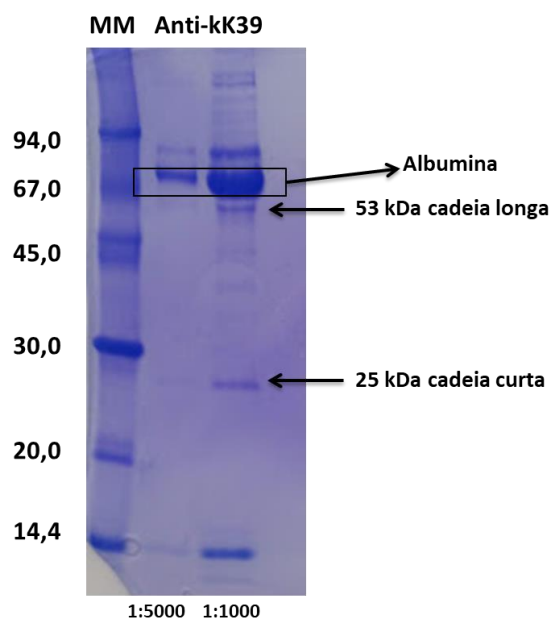


Figura 10 - Perfil eletroforético do anticorpo policlonal anti- K39 em gel de SDS-PAGE (12,5%) nas diluições de 1:5000 e 1:1000.

Fonte: autoral.

As bandas destacadas dentro do retângulo representam a albumina, uma proteína presente no plasma humano que é responsável pela constante manutenção dos níveis de líquido nos vasos sanguíneos. Ela tem alto peso molecular, em torno de 67 kDa, e aparece expressivamente pois não foi feita uma purificação para retirada da mesma visto que a quantidade de soro adquirido a partir dos camundongos foi pequena.

A presença da albumina, como podemos perceber após as análises de sensibilidade e especificidade do anticorpo, não interfere na incorporação da K39.

4.3. Análise da sensibilidade e especificidade do anticorpo policlonal anti-leishmania produzido.

4.3.1. Avaliação por *Immunoblotting*

O *Immunoblotting* consiste em uma técnica de biologia molecular que permite separar as proteínas pelos pesos moleculares a partir de uma eletroforese, uma transferência delas para uma membrana e detecção da proteína de interesse com um anticorpo específico. Assim, tem por finalidade avaliar a especificidade e a

sensibilidade da interação de um antígeno com seu anticorpo específico. É realizado em quatro etapas principais: a separação das proteínas por massa através de SDS-PAGE, a eletrotransferência dessas proteínas do gel de poliacrilamida para uma membrana de nitrocelulose, a interação do antígeno da membrana com o seu anticorpo e finalmente a interação do anticorpo que envolve o antígeno com um anticorpo secundário marcado com enzimas ou com radioisótopos (MAGI e LIBERATORI, 2005). O *immunoblotting* foi realizado com o intuito de verificar a especificidade do anticorpo policlonal produzido (anti-K39) frente o antígeno ou a proteína K39 (Figura 11). O uso de anticorpos policlonais tende a aumentar a sensibilidade dos testes imunocromatográficos, característica importante para o diagnóstico de doenças.

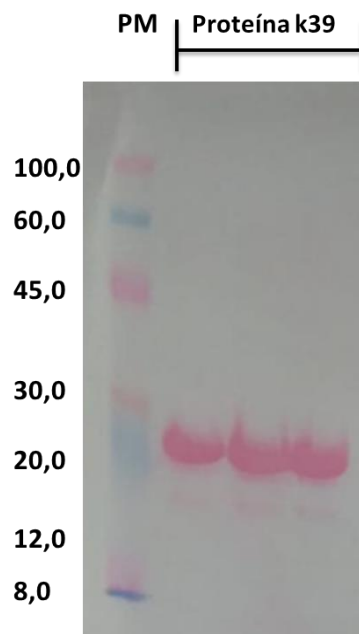


Figura 11 - Perfil da proteína K39 após transferência do gel para membrana de nitrocelulose corada com reagente Ponceau S. PM: padrão molecular *Colorburst* (Sigma).

Fonte: autoral.

Desse modo, diferentes diluições do anticorpo policlonal foram avaliados qualitativamente por *immunoblotting* contra amostras de antígenos puros ou da proteína K39, no qual apresentaram um largo número de bandas, com padrão de perfil entre 60 a 8 kDa (Figura 12).

Bandas proeminentes foram visualizadas em todas as diluições de anticorpo policlonal testados (1:25, 1:50, 1:100, 1:250 e 1:500). É possível observar que na diluição de 1:500 do anticorpo policlonal anti-K39 a banda antigênica da proteína K39 foi mais evidente. Este resultado demonstra que houve reatividade do anticorpo policlonal anti-K39 frente à proteína K39. Outro aspecto a ser considerado é a presença de bandas inespecíficas, ocorrência muito comum em anticorpos policlonais (Figura 11).

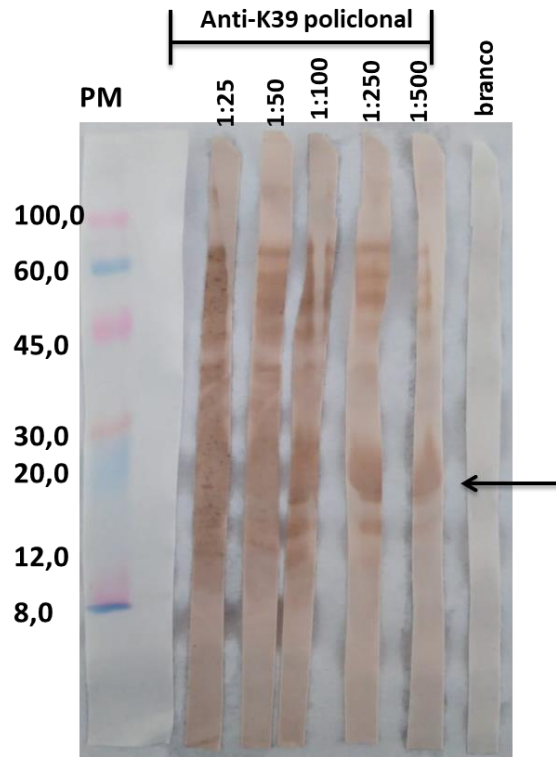


Figura 12 - Detecção da proteína imunogênica por *immunoblotting* usando o anticorpo policlonal anti-K39 e o anti-IgG de camundongo marcado com peroxidase e revelados com DAB (diaminobenzidina).

Fonte: autoral.

Legenda: PM: padrão molecular para *immunoblotting* Colorburst (Sigma), canaletas: amostras do antígeno K39 incubadas com anticorpo policlonal anti-K39 em diferentes diluições (1: 25, 1:50, 1:100, 1:250 e 1:500).

4.3.2. Teste Imunoenzimático ELISA

O ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) indireto foi realizado para analisar a sensibilidade e a especificidade do anticorpo produzido para detecção da *Leishmania infantum*. O teste consistiu na aderência do antígeno à placa e posterior

adição do anticorpo policlonal anti-K39 produzido em camundongo, somando-se posteriormente o anticorpo secundário (anti-IgG de camundongo) produzido em cabra e conjugado com uma peroxidase para conseguirmos visualizar em espectrofotômetro se ocorreu ou não a ligação do antígeno ao anticorpo.

A partir dos resultados da padronização do ELISA para anticorpo policlonal anti-K39, que foram feitos em duplicatas e obtidos pela medição da densidade óptica em espectrofotômetro com comprimento de onda de 450 nm, foi calculada a média (Tabela 2). Os cálculos foram satisfatórios e dentro do esperado, porém embora foram obtidos valores maiores na concentração 1:1000, a última média foi um número maior do que a penúltima, diferentemente da concentração 1:5000 que foi totalmente crescente, apesar de valores ligeiramente mais baixos.

Tabela 2. Média das absorvâncias obtidas com o teste de ELISA a 450nm.

Concentração de Antígeno ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Anticorpo policlonal Anti-K39	
	1:1000	1:5000
Abs _{450 nm}		
0	0,094	0,084
0,1	0,756	0,176
0,5	2,199	0,618
1,0	2,340	0,817
2,0	2,064	0,918

Fonte: autoral.

Quando foram plotados os resultados em um gráfico para melhor visualização (Figura 13), o eixo X representando a concentração em $\mu\text{g mL}^{-1}$ de antígenos imobilizado nas placas e o eixo Y a média das densidades ópticas obtida por espectrofotômetro em comprimento de onda de 450 nm após a incubação com os anticorpos primário e secundário. As linhas azul e vermelha correspondem, respectivamente, ao anticorpo policlonal anti-K39 nas diluições 1:1000 e 1:5000, respectivamente.

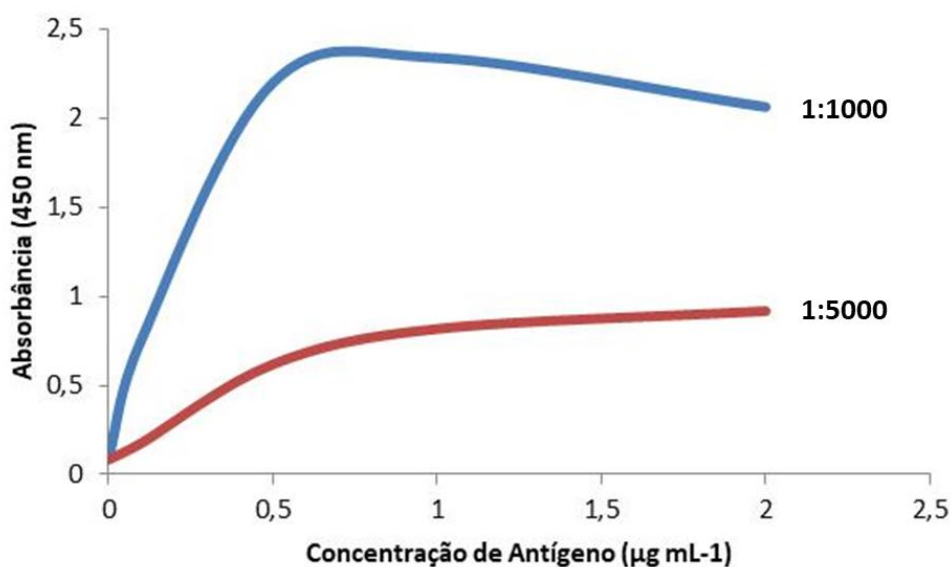


Figura 13 -Gráfico de absorvância construído a partir da média dos resultados do teste de ELISA para o anticorpo anti-K39.

Fonte: autoral.

Esse resultado mostra que as densidades ópticas foram, no geral, maiores para as amostras mais concentradas, como em 1:1000 comparado a diluição de 1:5000. Mesmo com o último resultado de 1:1000 sendo menor que o penúltimo, podemos considerar que a sensibilidade do anticorpo foi considerada satisfatória. Ressalta-se ainda que a concentração de antígeno ou de proteína K39 imobilizada de $0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$, nas diferentes diluições de anticorpo policlonal anti-K39 testadas, foi suficiente para obter uma maior absorvância ou sensibilidade.

Assim, o antígeno K39 apresentou valores adequados que possibilitam seu uso para diagnóstico em formato de ensaio imunoenzimático ELISA, corroborando com resultados de estudos anteriores que demonstraram sua viabilidade na Índia, no Brasil e em países do Mediterrâneo (SINGH *et al.*, 1995; BADARO *et al.*, 1996; MAALEJ *et al.*, 2003)

4.3.3. Teste Imunocromatográfico

Para avaliar a sensibilidade e especificidade do anticorpo produzido contra a proteína K39 da *L. infantum*, um teste imunocromatográfico preliminar foi realizado.

Para tanto, a proteína K39 bem como o anticorpo policlonal anti-K39 foram enviados a Empresa ParteCurae Pesquisa e Desenvolvimento Ltda para testa-los. Como modo de preservar o sigilo da empresa, a metodologia não pôde ser citada neste documento.

As fitas testes desenvolvidas para a detecção de *L. infantum* foi elaborado como mostrado na Figura 14. Neste formato, o resultado positivo foi caracterizado pela presença de uma linha vermelha na região teste, além de uma linha vermelha na região controle. Contrariamente, para a amostra controle analisada não se observou a presença da linha teste nos primeiros minutos após a aplicação da amostra, mostrando apenas a presença de uma única linha vermelha, apenas na região controle. Ressalta-se que após alguns minutos de aplicação, foi observada uma linha vermelha fraca na região teste da plataforma controle (dados não mostrados). Assim, novos experimentos, utilizando a plataforma imunocromatográfica, serão realizados para padronizar a validação deste anticorpo policlonal anti-K39 em testes de diagnóstico de *L. infantum*.

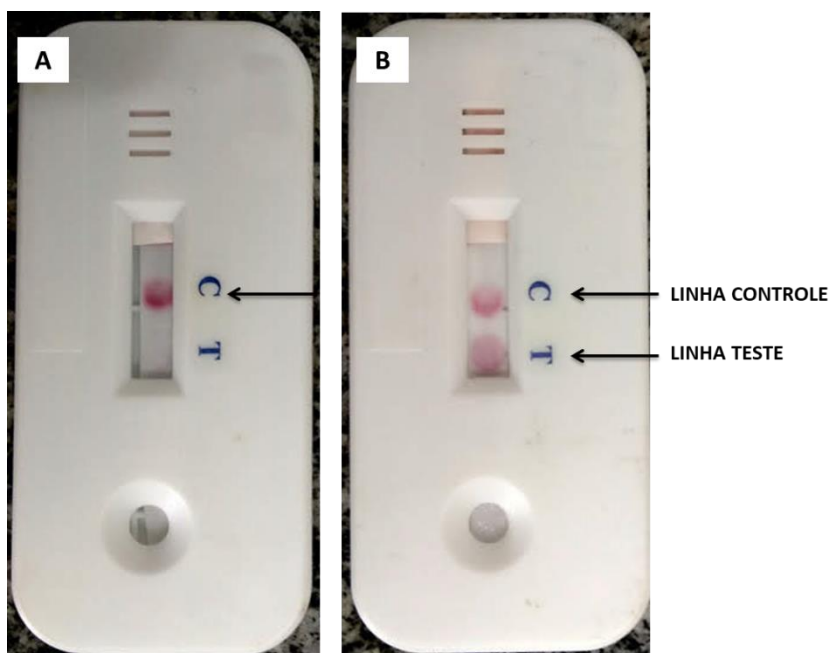


Figura 14 - Resultado do teste após a aplicação das suspensões do anticorpo policlonal anti-K39 produzido em camundongo. A) Controle negativo B) Controle positivo.

Fonte: autoral.

5. CONCLUSÃO

No trabalho foi possível preparar e testar os procedimentos para a criação de um teste mais específico a partir de anticorpos produzidos para detecção de *Leishmania* spp. Os resultados positivos permitem que estudos posteriores padronizem a validação imunocromatográfica do anticorpo policlonal anti-K39 em diagnósticos e realizem testes com soros humanos e caninos contaminados para identificar o patógeno.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A. K., LICHTMAN, A. H; SHIV, P. **Imunologia Celular e Molecular**, 8º ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2015.

ALVARENGA, D. G. de; ESCALDA, P. M. F.; COSTA, A. S. V. da; MONREAL, M. T. F. D. Leishmaniose visceral: estudo retrospectivo de fatores associados à letalidade. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43, n. 2, p. 194-197. 2010 .

ARRUDA, L. V. **Desenvolvimento de plasmídeo para expressão protéica dependente da fase do ciclo de vida em Leishmania**. 2013. 72p. Tese (Doutorado) - Universidade Federal da Bahia. Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador.

ASSIS, T. S. M. de; BRAGA, A. S. da C.; PEDRAS, M. J.; BARRAL, A. M. P.; SIQUEIRA, I. C. de; COSTA, C. H. N.; COSTA, D. L.; HOLANDA, T. A.; SOARES, V. Y. R.; BIÁ, M.; CALDAS, A. de J. M.; ROMERO, G. A. S.; RABELLO, A. Validação do teste imunocromatográfico rápido IT-LEISH® para o diagnóstico da leishmaniose visceral humana. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 17, n. 2, p. 107-116. 2008.

BADARO, R.; BENSOU, D.; EULALIO, M. C.; FREIRE, M.; CUNHA, S.; NETTO, E. M.; PEDRAL-SAMPAIO, D.; MADUREIRA, C.; BURNS, J. M.; HOUGHTON, R. L.; DAVID, J. R.; REED, S. G. rK39: a cloned antigen of *Leishmania chagasi* that predicts active visceral leishmaniasis. **Journal of Infectious Diseases**, v. 173, p. 758-761. 1996.

BASANO, S. de A.; CAMARGO, L. M. A. Leishmaniose tegumentar americana: histórico, epidemiologia e perspectivas de controle. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 7, n. 3, p. 328-337. 2004.

BESTEIRO, S.; WILLIAMS, R. A M.; COOMBS, G. H.; MOTTRAM, J. C. Protein turnover and differentiation in *Leishmania*. **International journal for parasitology**, v. 37, n. 10, 1063–1075, 2007.

BURNS, J. M.; SHREFFLER, W. G.; BENSON, D. R.; GHALIB, H. W.; BADARO, R.; REED, S. G. Molecular characterization of a kinesin-related antigen of *Leishmania chagasi* that detects specific antibody in African and American visceral leishmaniasis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 90, p. 775–779. 1993.

CARVALHO, E. M; BARRAL, A.; COSTA, J. M. L.; BITTENCOURT, A. L.; MARSDEN, P. Clinical and immunopathological aspects of disseminated cutaneous leishmaniasis. **Acta Tropica**, v. 56, p. 315-325. 1994.

COELHO, L. I. de A. R. da C. **Caracterização de *Leishmania* spp em amostras isoladas de pacientes portadores de leishmaniose tegumentar americana em**

área endêmica da região Norte, Brasil. 2010. 94P. Tese (Doutorado) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Recife.

DOURADO, Z. F.; SILVA, H. D.; SILVEIRA-LACERDA, E. de P.; GARCÍA-ZAPATA, M. T. A. Panorama histórico do diagnóstico laboratorial da leishmaniose visceral até o surgimento dos testes imunocromatográficos (rk39). **Revista de Patologia Tropical**, v. 36, n. 3, p. 205-214. 2007.

FIGUEIREDO FILHO, A. F.; FIGUEREDO, M. C.; NASCIMENTO, J. M.; CALVOSA, V. S. P.; PÓVOA, M. M.; MACHADO, R. L. D. Performance of na immunochromatography test for vivax malaria in the Amazon region, Brazil. **Revista de Saúde Pública**, v. 37, n. 3, p. 390-392, 2003.

GENBANK, 2007, NCBI-GenBank Flat File Release 160.0, <ftp://ftp.ncbi.nih.gov/genbank/gbrel.txt>.

GONTIJO, B.; CARVALHO, M. L. R. American cutaneous leishmaniasis. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, p. 71-80. 2003.

GRAMICCIA, M.; GRADONI, L. The current status of zoonotic leishmaniasis and approaches to disease control. **International Journal for Parasitology**, v. 35, n. 11-12, p. 1169–1180. 2005.

GUERIN, P. J.; OLLIARO, P.; SUNDAR, S.; BOELAERT, M.; CROFT, S. L.; DESJEUX, P.; WASUNNA, M. K.; BRYCESOSN, A. D. M. Visceral leishmaniasis: current status of control, diagnosis and treatment, and a proposed research and development agenda. **The Lancet**, v. 83, p. 93-101. 2002.

INSTITUTO OSWALDO CRUZ (2018). Tudo sobre os flebotomíneos do Brasil. Disponível em: www.fiocruz.br. Acesso em 02 dez 2020.

JARAMILLO, T. M. G. **Caracterização celular e imunológica da interação células dendríticas - *Leishmania braziliensis***. 2014. 127p. Dissertação. Universidade de Brasília, Brasília.

KHOURI, G. J. **Desenvolvimento de teste imunocromatográfico multiplexado para diagnóstico rápido de diferentes patógenos**. 2018. 26p. Monografia – Bacharelado em Biotecnologia, Universidade Federal de São Carlos. São Carlos.

KRAUSPENHAR, C.; BECK, C.; SPEROTTO, V.; SILVA, A. A. da; BASTOS, R.; RODRIGUES, L. Leishmaniose visceral em um canino de Cruz Alta, Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Rural**, v. 37, p. 907-910. 2007.

KAYE, P.; SCOTT, P. Leishmaniasis: complexity at the host – pathogen interface. **Nature Publishing Group**, v. 9, n. 8, p. 604–615, 2011.

KUBY, J.; CAMERON, J.; TODD, C.; MITCHELL, J. **Kuby Imunologia**. 6ª Ed. Rio de Janeiro: Livraria e Editora Revinter Ltda, 2008.

KUMAR, R.; PAI, K.; PATHAK, K.; SUNDAR, S. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Recombinant K39 Antigen in Diagnosis and Prognosis of Indian Visceral Leishmaniasis. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 8, n. 6, p. 1220–1224. 2001.

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

JAPOLLA, G.; ALMEIDA, G. R.; JUNIOR, J. P. da C.; BATAUS, L. A. M.; SOUZA, G. L. R. de. Teste imunocromatográfico de fluxo lateral: uma ferramenta rápida de diagnóstico. **Enciclopédia Biosfera**, v. 11, n. 22, p. 2635-2649, 2015.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. Evolution, classification and geographical distribution. In: PETER, W.; KILLICK-KENDRICK, R. (Ed.). **The leishmaniasis in biology and medicine**. London: Academic Press, 1987. v. 1, p. 1-120.

LEMOS, E. M.; CARVALHO, S. F. G.; COREY, R.; DIETZE, R. Avaliação do teste rápido utilizando o antígeno recombinante K39 no diagnóstico da leishmaniose visceral no Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n. 2, p. 36-38. 2003.

LESSA, M. M.; LESSA, H. A.; CASTRO, T. W. N.; OLIVEIRA, A.; SCHERIFER, A.; MACHADO, P.; CARVALHO, E. M. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**, v. 73, n. 6, p. 843-847. 2007.

LEVINE, N. D.; CORLISS, J. O.; COX, F. E. G.; DEROUX, G.; GRAIN, J.; HONIGBERG, B. M.; LEEDALE, G. F.; LOEBLICH, A. R.; LOM, III. J.; LYNN, D.; MERINFELD, E. G.; PAGE, F. C.; POLJANSKY, G.; SPRAGUE, V.; VAVRA, J.; WALLACE, F. G. A newly revised classification of the protozoa. **Journal of Protozoology**, v. 27, n. 1, p. 37-58. 1980.

LLANOS-CUENTAS, E.; MARSDEN, P. D.; CUBA, C.; BARRETO, A.; CAMPOS, M. Possible risk factors in development of mucosal lesion in leishmaniasis. **The Lancet**, v.2, p. 295.1984.

LUCIANO, R. M.; LUCHEIS, S. B.; TRONCARELLI, M. Z.; LUCIANO, D. M.; LANGONI, H. Avaliação da reatividade cruzada entre antígenos de *Leishmania* spp e *Trypanosoma cruzi* na resposta sorológica de cães pela técnica de imunofluorescência indireta (RIFI). **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 46, n. 3, p. 181-187. 2009.

MAALEJ, I. A.; CHENIK, M.; LOUZIR, H.; BEN SALAH, A.; BAHLOUL, C.; AMRI, F.; DELLAGI, K. Comparative evaluation of ELISAs based on ten recombinant or purified *Leishmania* antigens for the serodiagnosis of Mediterranean visceral leishmaniasis. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 68, p. 312-320. 2003.

MACHADO, J.; OLIVEIRA, T. A.; ZÓBOLI, A. P.; DIAS, C. M.; TÓTALA, A. H., PEREIRA, M. A. F.; SOARES, I. Desenvolvimento de teste imunocromatográfico para detecção de proteínas não estruturais da dengue. **BBR - Biochemistry and Biotechnology Reports**, v. 2, n. 2, p. 73-75. 2013.

MAGI, B.; LIBERATORI, S. Immunoblotting techniques. **Methods in Molecular Biology**, v. 295, p. 227-254, 2005.

MARQUES, C. H. **Aspectos fundamentais à implantação da tecnologia de produção de anticorpos monoclonais humanizados com potencial aplicação terapêutica**. 2005. 126p. Tese (Mestrado) - Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.

MARTINS, G. A. S.; LIMA, M. D. Leishmaniose: Do Diagnóstico ao Tratamento. **Enciclopédia Biosfera**, v. 9, n. 16, p. 2556-2569. 2013.

MCCALL, L. I.; ZHANG, W. W.; MATLASHEWSKI, G. Determinants for the development of visceral leishmaniasis disease. **PLoS pathogens**, v. 9, n. 1, p. e1003053. 2013.

MILLIPORE. **Rapid Lateral Flow Test Strips, Considerations for product development**. Darmstadt, 36p, 2013.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Manual de vigilância de leishmaniose tegumentar**. 1 Ed., Brasília: versão eletrônica, 2017.

NADERER, T.; MCCONVILLE, M. J. The Leishmania-macrophage interaction: a metabolic perspective. **Cellular microbiology**, v. 10, n. 2, p. 301-308. 2008.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION (NCBI) [Internet]. **Bethesda (MD): National Library of Medicine (US)**, National Center for Biotechnology Information; [1988] – [cited 2020 Dez 10]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

NEVES, D. P.; ANAMARIA, R. A. **Parasitologia Humana**. 11 Ed., São Paulo: Editora Atheneu, 2016.

NOGUEIRA, C. T. **Busca de antígenos para diagnóstico da leishmaniose visceral canina: potencial uso e aplicação da proteína rLc36**. 2014. 104p. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Araraquara.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). **Leishmaniasis**. 2018. <<https://www.who.int/health-topics/leishmaniasis>>. Acesso em: 30 de novembro de 2020.

PALATNIK-DE-SOUSA, C. B.; SANTOS, W. R.; FRANÇA-SILVA, J. C.; COSTA, R. T.; REIS, A. B.; PALATNIK, M.; MAYRINK, W.; GENARO, O. Impact of canine control on the epidemiology of canine and human visceral leishmaniasis in Brazil. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 65, n.5, p. 510-517. 2001.

RATH, S.; TRIVELIN, L. A.; IMBRUNITO, T. R.; TOMAZELA, D. M.; JESÚS, M. N. de; MARZAL, P. C.; ANDRADE JUNIOR, H. F. de; TEMPONE, A. G. Antimoniais empregados no tratamento da leishmaniose: estado da arte. **Química Nova**, v. 26, n. 4, p. 550-555. 2003.

REKOM BIOTECH. Available from: <https://www.rekombiotech.com/en>

ROQUE, A. C. A.; LOWE, C. R.; TAIPA, M. A. Antibodies and genetically engineered related molecules: production and purification. **Biotechnology Progress**, v. 20, p. 639-654. 2004.

SARKAR, A.; GHOSH, S.; PAKRASHI, S.; ROY, D.; SEN, S.; CHATTERJEE, M. Leishmania strains causing self-healing cutaneous leishmaniasis have greater susceptibility towards oxidative stress. **Free radical research**, v. 46, n. 5, p. 665-673. 2012.

SCHUBACH, E. Y. P. **Validação da técnica de imunocromatografia rápida de duplo percurso para o diagnóstico de leishmaniose visceral canina em amostras de sangue total e soro**. 2011. 74p. Tese (Mestrado) – Universidade de Brasília, Brasília.

SHAN, S. LAI, W. XIONG, Y. WEI, H. XU, H. Novel strategies to enhance lateral flow immunoassay sensitivity for detecting foodborne pathogens. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, p. 745-753, 2015.

SINGH, S.; GILMAN-SACHS, A.; CHANG, K. P.; REED, S. G. Diagnostic and prognostic value of K39 recombinant antigen in Indian leishmaniasis. **Journal of Parasitology**, v. 81, p. 1000–1003. 1995.

STUDIER, F. W. Analysis of Bacteriophage T7 early RNAs and proteins on slab gels. **Journal of Molecular Biology**, v. 79, p. 237-248, 1973.

SUNDAR, S.; RAI, M. Laboratory diagnosis of visceral leishmaniasis. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 9, n. 5, p. 951-958. 2002.

TOWBIN, H.; STAEBELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 76, n. 9, p. 4350-4354, 1979.

TROIANO, L. D. C. **Produção e caracterização de anticorpos monoclonais anti-gp51 do vírus leucose bovina (VLB)**. 2009. 101p. Tese (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

VAISH, M.; BHATIA, A.; REED, S. G.; CHAKRAVARTY, J.; SUNDAR, S. Evaluation of rK28 antigen for serodiagnosis of visceral leishmaniasis in India. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 18, n. 1, p. 81-85. 2012.

VIANA, G. M. **Avaliação prospectiva do antígeno rK39 como indicador de doença ativa em leishmaniose visceral**. 1999. 111p. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de São Paulo, São Paulo.

VIEIRA-GONÇALVES, R.; PIRMEZ, C.; JORGE, M. E.; SOUZA, W. J. S.; OLIVEIRA, M. P.; RUTOWITSCH, M. S.; DA-CRUZ, A. M. Clinical features of cutaneous and disseminated cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis* in

Paraty, Rio de Janeiro. **International journal of dermatology**, v. 47, n. 9, p. 926-932. 2008.

WERNECK, G. L.; HASSELMANN, M. H.; GOUVÊA, T. G. Panorama dos estudos sobre nutrição e doenças negligenciadas no Brasil. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 16, n. 1, p. 39–62. 2011.