Universidade de São Paulo
Instituto de Química de São Carlos

Desenvolvimento de Testes Rápidos Imunocromatográficos Para Detecção de
Cinomose Canina

São Carlos – SP
2017

JULIA PEREIRA POSTIGO

**Desenvolvimento de Testes Rápidos Imunocromatográficos Para Detecção de
Cinomose Canina**

Dissertação apresentada ao Instituto de
Química de São Carlos da Universidade de
São Paulo como parte dos requisitos para a
obtenção do título de Mestre em Ciências

Área de concentração: Química Analítica e
Inorgânica

Orientador: Prof. Dr. Emanuel Carrilho

Exemplar revisado

O exemplar original encontra-se em acervo
reservado na Biblioteca do IQSC-USP

São Carlos – SP

2017

Agradecimentos

Agradeço a Deus por me dar forças todos os dias para seguir em frente e por me presentear com pessoas maravilhosas ao longo desse caminho.

Agradeço aos meus pais, meus exemplos, por me darem a oportunidade de crescer pessoalmente e profissionalmente, sempre me apoiando e me tranquilizando.

Agradeço ao meu irmão Matheus, pela influência positiva em me fazer enveredar pelos caminhos da ciência, pelas discussões produtivas e pela amizade desde sempre.

Agradeço à minha irmã Camila, pela cumplicidade, pelo modelo de guerreira que ela é e pelos presentes, Laura e Vicente.

Agradeço ao Marcelo, inicialmente noivo e recém marido, que sempre foi meu porto seguro e me incentivou nessa jornada e em todas as outras até aqui, com muito carinho e paciência.

Agradeço às minhas amigas de infância (Ana e Juliana), que estiveram comigo, diariamente, nos primeiros anos da minha vida e ainda estão (ainda que mais distante), me oferecendo uma amizade incondicional.

Agradeço aos meus amigos de faculdade (Daiane, Daniela, Eduardo, Gabriela, Júlia e Mirian), pela amizade mesmo que com a distância, sempre existente e forte.

Aos meus amigos desde à época do cursinho, Ewerton, Tania e Nathália, pelos cafés, pelas risadas, pelo apoio e bom humor em todos esses anos até aqui.

Agradeço ao Professor Emanuel, pela orientação e amizade, oferecidas nessa longa jornada que se estende desde o período de iniciação científica. E por confiar em meu trabalho.

Agradeço aos amigos do laboratório BioMicS, que mesmo mais distantes durante o mestrado sempre se mostraram solícitos e pessoas com quem eu posso contar profissionalmente e pessoalmente. Principalmente às meninas, que participaram ativamente na minha formação, me ensinando e aconselhando sempre.

Agradeço à toda equipe da ParteCurae (Beatriz, Debora, Regiane, Thiago e Larissa), que me acolheu para uma parceria, mas que se tornaram uma segunda família, confiando em mim até quando me faltava confiança, tornando a jornada mais agradável. Pelos momentos em laboratório e fora dele. Pela amizade e todo apoio.

Agradeço à Beatriz (Bia) e à Debora, pela amizade em todos os momentos até mesmo nos dias mais difíceis, sempre “incansáveis” e insistentes, mantendo o apoio uma à outra, tornando os dias mais alegres.

Agradeço ao IQSC pela infraestrutura e pela formação profissional excelentes e aos funcionários que aqui trabalham e fazem com que o nosso trabalho aconteça.

Agradeço à CAPES pela bolsa concedida. Ao CNPq, à FAPESP e ao INCTBio pelo financiamento durante todo esse projeto.

Obrigada!

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”.

(Madre Teresa de Calcutá)

Resumo

A cinomose canina, causada pelo Vírus da Cinomose Canina (VCC), é uma doença de grande importância não só no Brasil como no mundo. Isto se deve principalmente à sua vasta ocorrência, facilitada pelo tipo de transmissão que pode ser por contato com secreções respiratórias, oculares, por fezes e urina. Detectar rapidamente o vírus em animais contaminados é de extrema importância para que o controle aconteça de forma rápida e adequada, evitando o agravamento da doença, a disseminação e o aumento da mortalidade. O presente trabalho teve por objetivo desenvolver uma plataforma diagnóstica imunocromatográfica que possibilite a detecção rápida de biomoléculas relacionadas com esta doença. Os testes imunocromatográficos são por natureza plataformas de baixo custo e que fornecem resultados rápidos sem a necessidade de equipamentos para a interpretação. Essas plataformas são compostas por regiões diferentes de papéis ou membranas, constituídos de fibra de vidro (*sample pad* e *conjugate pad*), material celulósico (*sample pad* e *absorbent pad*) e nitrocelulose (região de detecção). Nesse trabalho, com o intuito de diminuir ainda mais o custo da plataforma, foi avaliada a possibilidade de substituição das diferentes regiões somente pelo do papel de filtro Whatman nº 1. Para isso, foi necessário a otimização de diversos reagentes e tratamentos que fossem capazes de modificar a estrutura do papel, deixando-o mais reativo frente às proteínas imobilizadas na região de detecção, como o periodato de sódio, divinilsulfona e tampão carbonato; e menos reativos, quando utilizado em outras regiões. Antes de iniciar os ensaios com o papel, os anticorpos foram avaliados por *immunoblotting* para verificar o funcionamento dos mesmos, em relação à sensibilidade e especificidade. Após a avaliação, os anticorpos foram imobilizados com sucesso no papel de filtro através do uso de tampão carbonado como reagente sensibilizador da celulose, levando à construção das regiões teste e controle. No *conjugate pad* o tratamento mais eficiente foi com a utilização de 5% de sacarose, 1% de albumina bovina e 0,5% de Tween-20 em tampão fosfato, que garantiu a liberação satisfatória dos conjugados para a região de detecção. Enquanto que na região de detecção, o melhor tratamento empregado, foi a imersão em tampão carbonato 0,2 mol L⁻¹ e pH 11, que resultou na melhor imobilização das proteínas e, conseqüentemente, em um sinal mais forte.

Abstract

Canine distemper, caused by the Canine Distemper Virus (CDV), is a disease of great importance not only in Brazil, but also in the world. This is due mainly to its vast occurrence, facilitated by the transmission pathways, which may occur through contact with respiratory and/or ocular secretions, feces and urine. Rapid detection of the virus in contaminated animals is extremely important so that control takes place quickly and properly, avoiding disease worsening, its dissemination and mortality increase. The present work aimed in developing an immunochromatographic diagnostic platform that allows rapid detection of biomolecules related to this disease. Immunochromatographic tests are naturally low-cost platforms that provide fast results without need for equipment for interpretation. These platforms are composed by different regions of paper or glass fiber membranes (sample pad and conjugate pad), cellulosic material (sample pad and absorbent pad), and nitrocellulose (detection region). In this work, with the intention of further platform's cost reduction, the possibility of replacing the different regions was evaluated by using only the Whatman nº 1 filter paper. For this, it was necessary to optimize several reagents and treatments that were capable of modifying the paper structure, making it more reactive to the proteins immobilized in the detection region, such as sodium periodate, divinylsulfone, and carbonate buffer; and less reactive paper when used in other regions. Before initiating the paper assays, the antibodies were evaluated by immunoblotting for verifying their function, regarding sensitivity and specificity. After the evaluation, the antibodies were successfully immobilized on the filter paper with the use of carbonate buffer as the cellulose sensitizer reagent, leading to the construction of the test and control regions. In the conjugate pad the most efficient treatment was the use of 5% sucrose, 1% bovine serum albumin and 0.5% Tween-20 in phosphate buffer, which ensured the satisfactory release of the conjugates to the detection region. While in the detection region, the best treatment employed was immersion in carbonate buffer 0.2 mol L^{-1} and pH 11, which resulted in better immobilization of proteins, consequently, a stronger signal.

Lista de Figuras

Figura 1.	Representação esquemática do vírus da cinomose canina ilustrando a proteína F, responsável pela fusão do vírus à célula e a proteína H, responsável pelo ancoramento do vírus à célula hospedeira. Essas são proteínas estruturais. O material genético representado é RNA.	20
Figura 2.	Desenho esquemático de um teste de fluxo lateral ilustrando todos os componentes relevantes para o funcionamento, sendo eles: <i>sample pad</i> , <i>conjugate pad</i> , membrana de nitrocelulose e <i>absorbent pad</i> .	23
Figura 3.	Esquema comparativo de testes de fluxo lateral.	24
Figura 4.	Perfil eletroforético em SDS-PAGE 12,5% de proteínas obtidas do extrato total de VCC (após a etapa de limpeza).	35
Figura 5.	Detecção de proteínas imunogênicas por <i>immunoblotting</i> usando anticorpos marcados com peroxidase e revelados com DAB (diaminobenzidina).	37
Figura 6.	Detecção de proteínas imunogênicas por <i>immunoblotting</i> usando anticorpos marcados com peroxidase e revelados com DAB (diaminobenzidina).	38
Figura 7.	Detecção de proteínas imunogênicas de amostras de célula VERO por <i>Immunoblotting</i> .	39
Figura 8.	Ensaio de <i>immunoblotting</i> com anti-IgG de camundongo produzido em coelho conjugado com peroxidase.	41
Figura 9.	Perfil eletroforético SDS-PAGE 12,5% de vacina de cinomose em degradação.	42
Figura 10.	Representação esquemática de uma conjugação por adsorção entre a nanopartícula de ouro e uma densidade de carga positiva, nesse caso o anticorpo.	53
Figura 11.	Avaliação dos diferentes protocolos de tratamento de conjugado/ <i>conjugate pad</i> . Acima de cada par de dispositivos especifica-se os reagentes distintos de cada protocolo.	54
Figura 12.	Comparação da eficiência de liberação de conjugado entre fibra de vidro Standard 14 e papel de filtro celulósico Whatman nº 1.	55
Figura 13.	Representação esquemática das modificações na estrutura e reatividade da celulose.	57
Figura 14.	Tiras de papel Whatman nº 1 oxidadas com periodato de sódio, sensibilizadas com anticorpo e reduzidas com boroidreto de sódio.	57
Figura 15.	Tiras de papel Whatman nº 1 oxidadas com periodato de sódio, sensibilizadas com anticorpo e reduzidas com boroidreto de sódio.	58

Figura 16.	Tira de papel Whatman nº 1 oxidadas com periodato de sódio, sensibilizadas com anticorpo e reduzidas com boroidreto de sódio.	59
Figura 17.	Permeação do conjugado por um <i>microchip</i> bloqueado com BSA 1%, sem a imobilização das regiões de captura, para avaliar a eficiência do <i>design</i> do microchip.	60
Figura 18.	Representação esquemática da alteração da cadeia de glicose na estrutura da celulose do papel Whatman nº1 pela ação da divinilsulfona em pH 11.	61
Figura 19.	Tiras de papel Whatman nº 1 tratadas por 2 h de imersão em DVS em tampão carbonato e pH 11, bloqueadas com BSA e sem bloquear, apenas com PBST.	62
Figura 20.	Tiras de papel Whatman nº 1 tratadas por 2 h de imersão em DVS 10% em tampão carbonato e pH 11, boqueadas com BSA e sem bloquear, apenas com PBST.	63
Figura 21.	Tiras de papel Whatman nº 1 somente com as regiões de captura tratadas com DVS 10% em tampão carbonato e pH 11. Excesso de DVS removido com NaBH ₃ .	64
Figura 22.	Tiras de Whatman nº 1 tratadas com DVS.	65
Figura 23.	Tiras de Whatman nº 1 tratadas com tampão carbonato 0,1 mol L ⁻¹ em pH 11.	67
Figura 24.	Variação dos tempos de bloqueio das tiras de papel Whatman nº 1 tratado com tampão carbonato 0,1 mol L ⁻¹ em pH 11.	68
Figura 25.	Tiras tratadas com tampão carbonato em pH 11, com região controle imobilizada. Sem conjugado, coradas com Ponceau S antes da etapa de bloqueio.	69
Figura 26.	Tiras tratadas com tampão carbonato em pH 11, com 6 µg de IgG anti-VERO produzido em camundongo imobilizado na região controle.	70
Figura 27.	Tiras tratadas com tampão carbonato 0,2 mol L ⁻¹ em pH 11, com regiões teste e controle imobilizadas.	71
Figura 28.	Tiras tratadas com tampão carbonato 0,2 mol L ⁻¹ em pH 11, com regiões teste e controle imobilizadas.	72

Lista de abreviaturas

- **anti-IgG:** anti-imunoglobulina G
- **AuNPs:** nano partículas de ouro
- **BSA:** *bovine serum albumin* – soro albumina bovina
- **CDV-Ag:** *Canine Distemper Virus Antigen* – antígeno do vírus da cinomose canina
- **CHAPS:** hidrato de 3-[(3-colamidopropil)dimetilamônio]-1-propanosulfonato
- **DAB:** diaminobenzidina
- **DMEM:** Dulbecco's Modified Eagle's Medium – Meio de cultura Eagle modificado por Dulbecco
- **DVS:** divinilsulfona
- **EDC:** *N*-etil-*N'*-(3-(dimetilamino)propil)carboimida
- **HIV:** *human immunodeficiency virus* – vírus da imunodeficiência humana
- **IgG:** imunoglobulina G
- **kDa:** kilodaltons
- **NHS:** *N*-hidroxisuccinimida
- **PBS:** *phosphate buffered saline* – tampão fosfato salino
- **PBST:** tampão fosfato salino acrescido de 0,05% de Tween-20
- **PEG 6000:** polietilenoglicol com massa molar 6000 g mol⁻¹
- **pH:** potencial hidrogeniônico
- **RNA:** *ribonucleic acid* – ácido ribonucleico
- **RT-PCR:** *reverse transcription polymerase chain reaction* – transcrição reversa da reação em cadeia da polimerase
- **SDS:** *sodium dodecyl sulfate* – dodecil sulfato de sódio

- **SDS-PAGE:** *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis* – eletroforese em gel de poliacrilamida acrescido de dodecil sulfato de sódio
- **TCA:** *trichloroacetic acid* – ácido tricloroacético
- **TEMED:** *N,N,N',N'*-tetrametiletilenediamina
- **Tris-HCl:** cloridrato de 2-amino-2-(hidroximetil)-1,3-propanodiol
- **Tween-20:** monolaurato de polioxietilenosorbitano
- **VCC:** vírus da Cinomose Canina

Sumário

Capítulo 1: A cinomose e imunoensaios de fluxo lateral	17
1.1 A Cinomose canina	18
1.2 Diagnósticos baseados em imunoensaios de fluxo lateral	21
1.3 Desenho do teste imunocromatográfico de detecção direta.....	22
1.4 A importância do teste imunocromatográfico na detecção da cinomose	24
1.5 Funcionamento do teste	25
1.6 Objetivos	28
1.6.1 Objetivo geral.....	28
1.6.2 Objetivos específicos	28
Capítulo 2: Avaliação dos antígenos e anticorpos por immunoblotting	29
2.1 Metodologia – O ensaio de <i>immunoblotting</i>	30
2.2 Antígeno da cinomose canina (VCC)	30
2.2.1 Purificação dos antígenos da cinomose	30
2.2.2 Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE).....	31
2.3 Análise do anticorpo IgG monoclonal anti-VCC	32
2.3.1 Ensaio de <i>immunoblotting</i>	32
2.4 Resultados e discussão.....	34
2.4.1 Purificação do antígeno da cinomose	34
2.4.2 Ensaio de <i>immunoblotting</i>	36
Capítulo 3: O kit – Desenvolvimento da plataforma imunocromatográfica usando papel de filtro.....	44
3.1 Região de detecção.....	45
3.1.1 Metodologia aplicada à região de detecção utilizando papel de filtro Whatman nº 1 (<i>GE Healthcare</i>).....	46
3.1.1.1 Tratamento da região de detecção com periodato de sódio (NaIO_4).....	46
3.1.1.2 Tratamento da região de detecção com divinilsulfona (DVS)	47

3.1.1.3 Tratamento da região de detecção com tampão carbonato 0,1 e 0,2 mol L ⁻¹ em pH 11	47
3.1.2 Metodologia aplicada à região da membrana de nitrocelulose	47
3.2. Região de deposição do conjugado (<i>conjugate pad</i>).....	48
3.2.1. O conjugado.....	48
3.2.2. Processo de conjugação.....	48
3.2.3 Região <i>conjugate pad</i>	49
3.2.3.1 Tratamento de <i>conjugate pad</i> contendo sacarose.....	50
3.2.3.2 Tratamento de <i>conjugate pad</i> contendo leite desnatado.....	50
3.2.3.3 Tratamento de <i>conjugate pad</i> contendo PEG 6000.....	50
3.2.3.4 Tratamento de <i>conjugate pad</i> contendo Dextrana.....	50
3.2.3.5 Tratamento de <i>conjugate pad</i> contendo tampão Tris-HCl pH 7,5.....	51
3.3 Sample Pad.....	51
3.4 <i>Absorbent pad</i>	51
3.5 Resultados e Discussão	52
3.5.1 Região do <i>Conjugate Pad</i>	52
3.5.2 Região de detecção	56
3.5.2.1 Tratamento do Whatman nº 1 com periodato de sódio.....	56
3.5.2.2 Tratamento do Whatman nº 1 com divinilsulfona.....	60
3.5.2.3 Tratamento do papel de filtro Whatman nº 1 com Tampão Carbonato 0,1 e 0,2 mol L ⁻¹ em pH 11.....	66
Capítulo 4: Conclusões e Perspectivas Futuras.....	73
Referências Bibliográficas	76
Anexo	80

Prefácio

Esse trabalho foi dividido em quatro capítulos, para ampliar o entendimento e compreensão do conteúdo através da observação da dependência entre as etapas. O primeiro capítulo consiste de uma revisão da doença, do vírus e contágio, além do modelo do teste desenvolvido e funcionamento do mesmo. O segundo capítulo apresenta a avaliação por *immunoblotting* dos antígenos e anticorpos utilizados na confecção dos testes. O terceiro capítulo apresenta o desenvolvimento do teste, tanto na plataforma convencional como em uma plataforma de custo reduzido. O quarto capítulo apresenta uma conclusão geral do trabalho realizado bem como perspectivas para trabalhos futuros.

*Capítulo 1: A cinomose e imunoensaio de fluxo
lateral*

1.1 A Cinomose canina

A cinomose é uma das doenças viróticas mais relevantes no Brasil e no mundo, sendo responsável por uma das maiores taxas de *causa mortis* e eutanásia em cães. Por ser uma doença altamente contagiosa, a mesma afeta mamíferos das famílias *Canidae*, *Procyonidae* e *Mustelidae*,¹ destacando-se cães (domésticos e selvagens), pandas, quatis, guaxinins e furões, visons, doninhas, texugos e lontras,² sendo também encontrados casos raros em baleias, golfinhos e botos.³ Sem aparente predileção de raça e sexo, esta doença infectocontagiosa apresenta uma maior incidência em animais jovens podendo, no entanto, ser encontrada em todas as idades.⁴ No Brasil, a cinomose é responsável por 12,4% da mortalidade de cães adultos entre 1 e 9 anos.⁵

Essa doença pode infectar animais em qualquer época do ano, com predominância e preferencialmente no inverno. De acordo com as condições ambientais, o vírus pode sobreviver por 48 h à 25 °C ou até 14 dias à 5 °C.⁶ Esse é um dos motivos de ocorrerem surtos de cinomose no inverno, além do tipo de transmissão que preferencialmente se dá por via aérea ou respiratória através de gotículas de secreções ou por aerossóis.⁷ Já foi relatada a transmissão pelas fezes, urina e via placenta.⁶

Em relação a morbidade, a cinomose canina apresenta uma taxa que varia de 25 a 75% e sua letalidade de 50 a 90%, dependendo da cepa, sendo as mais patogênicas, a de *Snyder Hill* e *R252*, altamente neurotrópicas e imunossupressoras. Ressalta-se a raiva, causada pelo vírus da família *Rhabdoviridae*, a doença viral com letalidade mais elevada.⁸ Os cães acometidos apresentam como sintomas a produção de secreções nasais e oculares, hiperqueratose e dermatite, desmielinização, neurofagia, meningite mononuclear, dentre outros.⁹ Além da cinomose, outras doenças são causadas por essa família de vírus, dentre elas estão: o sarampo em primatas, a peste em artiodátilos e peste em pequenos ruminantes.⁶

O vírus da cinomose canina (VCC) pertence à Família *Paramyxoviridae* e ao Gênero *Morbillivirus*. Pleomórfico e com diâmetro variável entre 150 e 250 nm, o VCC

apresenta como material genético uma fita simples de RNA de cadeia negativa constituído de aproximadamente 16 kb.^{5,10}

O VCC (Figura 1) possui 8 proteínas sendo duas não estruturais (C e V) e seis proteínas estruturais: NP (proteína do nucleocapsídeo), P (fosfoproteína), M (proteína da matriz), F (proteína de fusão), H (hemaglutinina) e L (grande proteína). Externamente, ele é circundado por uma bicamada lipídica, o envelope viral, que é proveniente da célula hospedeira.³

No envelope, duas glicoproteínas (H e F) ficam evidentes, sendo a H responsável pelo ancoramento do vírus à célula hospedeira durante o início da infecção, sendo combatida pelo hospedeiro quando o sistema imune se encontra em condições normais, prevenindo a manifestação da doença no organismo, ou seja, ela é proteína responsável pela indução da produção da maioria dos anticorpos antivirais.

A proteína F é responsável pela fusão do vírus à célula hospedeira, após o mesmo se encontrar anexado. Além de fundir o vírus à célula hospedeira, a proteína F promove a fusão entre células hospedeiras, levando a formação de sincídios.^{2,5} A proteína M faz a ligação entre as ribonucleoproteínas com as proteínas do envelope. As proteínas P e L são responsáveis por regular a transcrição, a replicação e a eficiência de montagem dos nucleocapsídeos pela proteína N.

As proteínas V e C são codificadas pelo mesmo gene da proteína P, sendo que na sua síntese, o RNA passa por um processo de edição e a tradução se inicia em uma região diferente da fita. Ambas proteínas não são essenciais para a replicação do vírus, mas são fundamentais na neutralização da resposta imune inata do hospedeiro.¹¹

Figura 1. Representação esquemática do vírus da cinomose canina ilustrando a proteína F, responsável pela fusão do vírus à célula e a proteína H, responsável pelo ancoramento do vírus à célula hospedeira. Essas são proteínas estruturais. O material genético representado é RNA.

Fonte: POZZA, M, Dissertação: **Deteção e Análise Molecular do Virus da Cinomose Canina**. Porto Alegre, RS, Brasil, 2005. Figura 3: Representação tridimensional de um vírion de CDV. Modificado de http://www.virology.net/big_virology/EM/3Dvirus.jpgm.

Características do vírus como ser pantrópico ou multissistêmico (afinidade com diversos sistemas respiratórios, neurológico, cutâneo e gastrointestinal), bem como a diversidade de cepas com severidades distintas (umas mais neurotrópicas e virulentas que outras), fizeram da cinomose uma doença de grande impacto, principalmente na população canina. Relatos da década de 60, citam a descoberta da primeira vacina anti-VCC produzida a partir de amostras isoladas de cães infectados e uma drástica redução da incidência comparado aos anos anteriores. Entretanto, devido ao grande número de espécies susceptíveis ao VCC e por se tratar de um vírus altamente contagioso, a erradicação em cães é praticamente impossível,¹² visto que de 25 a 75% dos animais susceptíveis desenvolvem infecção subclínica e eliminam o VCC no ambiente, atuando assim, como fontes de infecção da doença.¹³

A infecção sistêmica geralmente se dá no sistema nervoso central e é diretamente dependente da resposta imune do animal. Após 24 horas da infecção, o vírus se instala nas amídalas e linfonodos bronquiais, onde ocorre sua replicação de 2 a

4 dias após a infecção. Nesse período, um pequeno número de células infectadas é encontrado em outros órgãos linfoides. Entre 4 e 6 dias, a proliferação nesses órgãos aumenta e o vírus se espalha para os tecidos epiteliais. Dentro de 8 a 9 dias a infecção atinge o sistema nervoso central e dos 9 aos 14 dias, o estágio da patogênese depende da resposta imune do hospedeiro. Os cães com título de anticorpos e citotoxicidade celular em níveis normais eliminarão o vírus da maior parte dos tecidos sem apresentar sinais clínicos. Já animais com baixa resposta imune, apresentarão disseminação do vírus para os demais tecidos, debilitando o animal e levando-o a óbito.⁶

Normalmente, o diagnóstico da cinomose é feito de forma clínica, com base na análise dos sintomas apresentados pelos animais durante o processo infeccioso. No entanto, esta é uma doença bastante imprevisível, avançando de forma diferente nos organismos, além disso, os sintomas iniciais são semelhantes às outras doenças infecciosas e inflamatórias do sistema nervoso, dificultando a identificação precisa. Desse modo, um diagnóstico precoce é importante para evitar a disseminação do vírus para outros animais, bem como aumentar as possibilidades de recuperação e/ou controle do animal.¹⁴

Métodos diretos, como o isolamento e a detecção do vírus ou de seus produtos, ou métodos indiretos que detectam e quantificam anticorpos antivirais específicos, têm sido utilizados como estratégias de diagnóstico de doenças. Entretanto, esses métodos representam alto custo, pois envolvem análises laboratoriais e mão de obra especializada, além de demandar tempo e mostrar resultados variáveis de acordo com a fase da infecção e os níveis de anticorpos.⁹ Nos testes laboratoriais, a confirmação da cinomose é realizada por meio de diagnóstico virológico, sorológico, molecular ou histopatológico, porém, algumas dessas técnicas tornam-se inviáveis por apresentar alto custo e demora na obtenção e divulgação dos resultados.

1.2 Diagnósticos baseados em imunoensaios de fluxo lateral

Imunoensaios de fluxo lateral, ou testes rápidos, ganharam grande popularidade a partir de 1980 devido à sua simplicidade e a sua capacidade em fornecer informações

precisas sem a necessidade da utilização de instrumentação ou reagentes adicionais. No geral, basta introduzir a amostra no dispositivo e o teste é realizado sem dificuldades em poucos minutos, podendo também ser testados um ou mais analitos, em uma mesma plataforma.¹⁵ No entanto, mesmo apresentando uma produção simples e barata, pesquisas intensivas ainda se fazem necessárias para o seu adequado desenvolvimento, uma vez que o teste deve funcionar corretamente, sem gerar resultados inconclusivos ou falsos positivos ou negativos.

Os testes imunocromatográficos podem ser facilmente produzidos em larga escala e tem seu tempo de prateleira entre 1 a 2 anos, sem a necessidade de refrigeração. Além disso, devido a facilidade no manuseio e na interpretação dos resultados, os mesmos podem ser usados em qualquer lugar, sem a necessidade de um operador qualificado. Em humanos, o imunoensaio de fluxo lateral mais famoso é o teste de gravidez, no entanto, hoje já existem testes rápidos para sífilis, HIV, giárdia, dengue, hepatite entre outros. Entretanto, várias áreas do mercado têm interesse em adquirir testes rápidos e baratos, dentre elas: ambiental, veterinária e a de saúde, visando principalmente o diagnóstico de doenças. Este trabalho em particular, é voltado para a medicina veterinária, entretanto, este modelo de plataforma poderá ser aplicado para qualquer área e qualquer doença de interesse, alterando somente os agentes de identificação (anticorpos e antígenos) depositados na tira.

1.3 Desenho do teste imunocromatográfico de detecção direta

Comumente, os testes de fluxo lateral são constituídos por diferentes tipos de papéis e/ou membranas porosas que se sobrepõem. Esses materiais têm propriedades distintas e são capazes de aumentar ou diminuir a velocidade do fluxo do líquido (geralmente fluido biológico ou extrato) sobre a plataforma. Os diversos fragmentos são colados com uma cola insolúvel em água e sensível à pressão,¹⁵ como pode ser visto na Figura 2.

Figura 2. Desenho esquemático de um teste de fluxo lateral ilustrando todos os componentes relevantes para o funcionamento, sendo eles: *sample pad*, *conjugate pad*, membrana de nitrocelulose e *absorbent pad*.

Fonte: Material de divulgação *ParteCurae* ©2015

O procedimento analítico baseia-se na deposição da amostra sobre a região denominada *sample pad* o qual poderá ser diluída em um tampão, se necessário, para auxiliar na fluidez do teste. A amostra migrará por capilaridade até a região do *conjugate pad*, onde nanopartículas de ouro coloidais (AuNPs) conjugadas com antígenos ou anticorpos foram previamente depositadas na etapa de fabricação.¹⁵ Após passar pela região do conjugado, a amostra continuará migrando, agora carreando as AuNPs conjugadas aos anticorpos em direção a membrana de nitrocelulose. É nessa região que ocorrerá a ligação dos antígenos e/ou anticorpos presentes na amostra com os imobilizados nos locais de captura (linhas teste e controle). Na extremidade superior do teste, está o *absorbent pad*, que atua auxiliando a migração e absorvendo o excesso de amostra depositada no teste.

A eficiência do teste será determinada pela concentração e qualidade dos reagentes depositados, já que a amostra promoverá o transporte dos mesmos através da membrana, fazendo com que eles atinjam as regiões de interação (linhas teste e controle). A presença das linhas indicará se o teste é positivo, negativo ou inválido (no caso de não aparecer linha controle, o que indicaria a falha no teste, Figura 2).

Os imunoenaios de fluxo lateral podem, também, ter como via de detecção a disposição sanduíche, que leva à detecção direta, ou a via competitiva, que leva à detecção indireta. Na forma direta de detecção, o resultado positivo resulta em duas

linhas coloridas (a teste e a controle). Na forma indireta de detecção, o resultado positivo resulta em apenas uma linha (a controle), pois a presença do alvo na amostra ocupa os sítios presentes na linha teste, impedindo que o conjugado se ligue e, consequentemente a não visualização da cor, como exemplificado na Figura 3.

Figura 3. Esquema comparativo de testes de fluxo lateral. **A.** Teste com detecção direta (sanduíche). **B.** Teste com detecção indireta (competitivo).

Fonte: Adaptado de Wong, C. R.; Tse, H. Y. **Lateral Flow Immunoassay**. Springer 2009. Fig 1.2a Direct solid-phase immunoassay e Fig. 1.2b Competitive solid-phase immunoassay. Acessado em 08/12/2014.

1.4 A importância do teste imunocromatográfico na detecção da cinomose

No mercado já existem testes rápidos para a detecção de antígeno do VCC em amostras de urina, saliva, soro, plasma ou líquido, e são, normalmente, usados para detectar a proteína F do envelope viral.¹⁴ Curti e colaboradores testaram a eficácia de um kit comercial Anigen CDV-Ag (Alere) para detecção de Ag-VCC e compararam os resultados obtidos com teste por reação em cadeia da polimerase antecedida de transcrição reversa (RT-PCR).¹⁴ Nesse trabalho quando os animais se encontravam com a doença em sua forma neurológica, o kit se mostrou incapaz de detectar a presença do antígeno, no entanto, quando os animais possuíam sinais sistêmicos, o

mesmo apresentou resultados positivos. Para a maioria dos casos testados, o kit não foi capaz de detectar a doença, fornecendo resultados falso-negativos uma vez que o mesmo se mostrou dependente do tipo de amostra analisada e do grau de infecção da doença.¹⁴ A partir desses resultados, foi sugerido a confecção de um teste imunocromatográfico voltados para a busca de anticorpo antiviral.

Dada a indiscutível relevância da Cinomose, estudos têm sido desenvolvidos para identificar e caracterizar os componentes moleculares antigênicos específicos para o VCC, com o intuito de melhorar o diagnóstico sorológico e aumentar os conhecimentos relacionados com a biologia molecular e celular.¹⁶

1.5 Funcionamento do teste

O teste imunocromatográfico tradicional (Figura 2) é composto por uma região para adicionar a amostra, o *sample pad* que deve ter como característica a retenção da fração indesejável da amostra, permitindo que apenas o analito seja carregado para a próxima etapa. Dessa forma, se a amostra consistir em sangue total, o *sample pad* deverá ser capaz de reter as hemácias e deixar passar apenas o soro. Caso necessário, a diluição da amostra em um tampão específico deverá ser realizada para auxiliar o carregamento. Sendo assim, além de promover a distribuição da amostra e tampão, controlar a velocidade e garantir a fluidez da amostra para o *conjugate pad*, a região do *sample pad* pode também agir como um filtro, prevenindo a entrada de materiais sólidos.

Após a deposição no *sample pad*, a amostra fracionada, será carregada para o *conjugate pad*, região essa composta basicamente de fibra de vidro, onde o conjugado (composto de AuNPs e anticorpo) será previamente depositado. A principal função do *conjugate pad* é transferir, de forma uniforme e eficiente, os reagentes para a membrana de nitrocelulose. Consequentemente, uma das dificuldades em otimizar essa região é impedir que o tratamento químico, necessário para facilitar a total fluidez dos reagentes, não desestabilize as partículas de ouro conjugadas, impedindo a sua liberação no momento desejado. No geral, os tratamentos do *conjugate pad* envolvem uma etapa de bloqueio, para que os sítios inespecíficos não interajam com o

conjugado, seguido de uma etapa de plastificação que permitirá a rápida liberação do conjugado após contato com a amostra. Essa plastificação pode ser feita com polímeros como o polietilenoglicol (PEG) ou sacarose.

Em relação ao conjugado, este consiste em um complexo de nanopartículas de ouro ou AuNPs com moléculas de interesse depositadas sobre sua superfície. As nanopartículas de ouro coloidais possuem cor vermelha intensa quando estáveis em suspensão e azuladas ou cinzas quando agregadas. Neste trabalho, às nanopartículas de ouro foram depositadas moléculas de anticorpo anti-IgG para a interação com o anticorpo IgG da amostra. Nesse caso, a deposição da molécula de interesse pode ser feita por adsorção física ou ligação covalente na superfície da partícula.

Um dos métodos mais frequentes de imobilização de proteínas em superfícies sólidas é por adsorção física, onde as de proteínas se ligam nas AuNPs devido as interações da porção hidrofóbicas e eletrostáticas. A adsorção é espontânea e o procedimento é simples de ser executado. No entanto, para que ocorra a adsorção das moléculas proteicas sobre as partículas é necessário haver uma mudança conformacional na proteína, expondo assim os resíduos hidrofóbicos para se ligarem às partículas, podendo, muitas vezes, levar à desnaturação da proteína. À camada inicial adsorvida, liga-se outra camada de proteínas que por sua vez possui conformação e atividade nativa. No mecanismo de imobilização por adsorção física a funcionalização das AuNPs necessita de uma concentração maior de anticorpo. Além disso, os mesmos se ligam à superfície das AuNPs com orientação aleatória, tornando difícil controlar a resposta biológica e consequentemente o sinal do teste. Por último, esse tipo de ligação é facilmente interrompida por alterações de pH, podendo levar a substituição das moléculas absorvidas quando o conjugado entra em contato com amostras biológicas.^{17,18} No entanto, pela simplicidade experimental e a falta de necessidade de reagentes adjacentes, fazem com que esse tipo de conjugação seja amplamente utilizado.

Outra opção de conjugação é por ligação covalente entre o anticorpo e as AuNPs. Para realizar esse tipo de conjugação existem duas opções possíveis: a) conjugação direta entre o grupamento tiol do anticorpo e a AuNPs que possui grande afinidade por enxofre; b) uso de uma molécula bifuncional, que se ligará por uma

extremidade à nanopartícula e pela outra ao anticorpo. É possível utilizar o sistema estrept(avidina)/biotina, os reagentes EDC/NHS ou moléculas de PEG tioladas. No entanto, alguns desses procedimentos podem gerar instabilidade as AuNPs e consequentemente à ocorrência de agregação das mesmas.¹⁸ Outra desvantagem desse método é o alto custo de alguns reagentes bifuncionais, bem como seus prazos de entrega, que fazem com que a conjugação por adsorção se torne mais atrativa.

Para a funcionalização do teste, a membrana de nitrocelulose, material mais utilizado na região de captura, deve apresentar compatibilidade com o tipo de amostra a ser analisada (como sangue, urina, plasma ou secreção) devido a uniformidade do fluxo lateral. Nessa região, também é necessário que as linhas teste e controle estejam bem definidas e aderidas à membrana. Em se tratando das membranas convencionais de nitrocelulose, somente a deposição dos reagentes nas linhas já é capaz de se ligarem fortemente no suporte sólido. No entanto, quando o material desta região é substituído por outro, como o papel de filtro Whatman nº 1, é necessário a imobilização por ligação covalente do papel com as proteínas ou anticorpos depositados, devido à menor reatividade deste tipo de papel em comparação à membrana de nitrocelulose. Posteriormente à imobilização das linhas, é necessária uma etapa de bloqueio da membrana, para a inativação dos possíveis sítios descobertos e dessa forma, impedir ligações inespecíficas entre o conjugado e a membrana. Alguns agentes de bloqueio, como a soro albumina bovina (BSA) e a caseína, necessitam ter as suas concentrações perfeitamente ajustadas, para não inibirem o sinal do teste, sem interferir na sua função de bloqueio da membrana.

Na extremidade superior do teste, encontra-se o *absorbent pad*, que atua como reservatório do excesso de amostra e do tampão de fluxo, bem como impulsor da capilaridade do sistema, atuando como força motriz para que mais líquido possa lixiviar o conjugado pelas regiões teste e controle, resultando no final da corrida o esgotamento do *conjugate pad* e uma tira seca.

Nos testes imunocromatográficos, a detecção é feita através da presença de uma linha intensa tanto na região teste (T) como controle (C). Resultados inconclusivos como: resposta cruzada (positivo para analitos diferentes do identificado no teste) e alto limite de detecção (deve apresentar resultado positivo para baixos níveis de infecção),

podem invalidar o teste. Além disso, para a detecção de anticorpos contra cinomose, objetivo deste estudo, um dos parâmetros a avaliar é o resultado positivo em animais vacinados.

1.6 Objetivos

1.6.1 Objetivo geral

- Confeccionar um teste rápido, sensível e específico para detecção de cinomose canina independente do estágio de agravamento da doença.

1.6.2 Objetivos específicos

- Realizar conjugação de AuNPs com anticorpos antivírus da cinomose canina;
- Desenvolver o *layout* e fabricar os microcanais hidrofílicos em papel utilizando uma impressora de cera para delimitar as barreiras hidrofóbicas;
- Imobilizar os anticorpos específicos no papel;
- Confeccionar os testes por completo e avaliar a sensibilidade e especificidade dos mesmos.

*Capítulo 2: Avaliação dos antígenos e anticorpos
por immunoblotting*

2.1 Metodologia – O ensaio de *immunoblotting*

O ensaio imunoenzimático *immunoblotting*, também conhecido por *Western blotting*, tem por finalidade avaliar a especificidade e a sensibilidade da interação de um antígeno com seu anticorpo específico, para identificação de uma determinada proteína dentre um *pool*, através de reações específicas. É realizado em quatro etapas principais: a separação das proteínas por massa através de eletroforese em gel de poliacrilamida em condições redutoras, 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.¹⁹

2.2 Antígeno da cinomose canina (VCC)

Antígenos da cinomose foram gentilmente cedidos pela Empresa ParteCurae Pesquisa e Desenvolvimento Ltda, na cidade de São Carlos, parceira do Grupo BioMicS (Bionalítica, Microfabricação e Separações), IQSC, USP, coordenado pelo Prof. Dr. Emanuel Carrilho, onde este projeto foi realizado.

2.2.1 Purificação dos antígenos da cinomose

O vírus da cinomose canina ou VCC foi cultivado em células VERO até o aparecimento do efeito citopático, com a formação de sincícios e destruição de aproximadamente 75% da monocamada de células. Foram realizados 3 ciclos de congelamento e descongelamento onde todo o conteúdo da cultura celular foi ressuspenso e centrifugado a 5000 $\times g$ por 20 min a 4 °C visando a remoção dos restos celulares contidos no meio. O sobrenadante foi então dispensado em alíquotas e armazenado a -20 °C. Para esse experimento partiu-se das alíquotas congeladas.

A precipitação foi realizada com sulfato de amônio a partir de 100 mL de meio de cultura contendo o antígeno solúvel. Inicialmente adicionou-se 20% (m/v) de sulfato de amônio e agitou-se por 15 min em temperatura ambiente. Centrifugou-se à 4500 $\times g$ por

10 min a 4 °C. O sobrenadante foi removido e a ele adicionou-se massa de sulfato de amônio suficiente para atingir 40% (m/v). A etapa anterior foi realizada até 70% (m/v) de sulfato de amônio.²⁰ O *pellet* de cada centrifugação foi ressuspensionado em 40 mL de solução de sulfato de amônio 40% (m/v). A suspensão foi centrifugada por 10 min à 4500 ×g, 4 °C e o *pellet* ressuspensionado em 40 mL de água deionizada. A solução foi dividida em duas partes iguais e cada alíquota foi lavada em membrana semipermeável de ultrafiltração (*GE Healthcare*) com *cut-off* de 3 kDa, com 3 alíquotas de 10 mL de água deionizada e até reduzir o volume total para 5 mL (2,5 mL em cada tubo) aproximadamente.

A solução concentrada passou por precipitação com etanol:acetona (1:1) e TCA 10% (m/v), na proporção de 9 volumes de solução precipitante para 1 volume de solução de proteína. Incubou-se por 16 h a -20 °C e centrifugou-se a 4 °C e 4500 ×g por 15 min. O *pellet* foi lavado 3 vezes com 10 mL de acetona gelada, seco e ressuspensionado em 2 mL de água deionizada. Um novo precipitado formou-se com adição de acetona gelada, seguida de incubação por *overnight* e centrifugação por 20.000 ×g, 15 min a 4 °C. A solução precipitante foi removida e o *pellet* seco em fluxo até completa remoção dos solventes. Posteriormente, o *pellet* foi ressuspensionado em 500 µL de solução de reidratação (7 mol L⁻¹ de ureia, 2 mol L⁻¹ de tiourea e 2% (m/v) de CHAPS) e armazenados em -20 °C até o uso. Foi feita uma análise de eletroforese em gel para avaliar a eficiência da precipitação.

2.2.2 Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE)

Os extratos proteicos foram avaliados por SDS-PAGE,^{21,22} e corados com *Coomassie brilliant blue*. O perfil eletroforético foi obtido utilizando-se uma cuba eletroforética Mini VE (*GE Healthcare*) em géis de 12,5% de acrilamida contendo 4,12 mL de solução de acrilamida 30% (m/v) e bis-acrilamida 0,8% (m/v) de monômeros, 2,5 mL de solução Tris-Base 1,5 mol L⁻¹ pH 8,8, 100 µL de solução de SDS 10% (m/v) em 3,19 mL de água deionizada e 3,3 µL de TEMED e 50 µL de persulfato de amônio 10% (m/v) como catalisadores. No gel de empilhamento (focalização) utilizou-se 372 µL de

uma solução acrilamida 30% (m/v) e bis-acrilamida 0,8% (m/v), 155 μL de solução Tris-Base 1,5 mol L^{-1} pH 8,8; 25 μL de solução de SDS 10% (m/v); 1,92 mL de água deionizada; 6,2 μL de TEMED e 25 μL de persulfato de amônio 10% (m/v). Os géis foram submetidos à corrente constante de 10 mA por 15 min e 15 mA até o final da corrida, por gel.

2.3 Análise do anticorpo IgG monoclonal anti-VCC

2.3.1 Ensaio de *immunoblotting*

A partir dos antígenos purificados, foram feitos dois géis de poliacrilamida 12,5%. Nas canaletas aplicou-se o padrão de massa molecular Colorburst (*Sigma Aldrich*), 15 μL de solução de proteína juntamente com 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, os géis foram submetidos à eletrotransferência para uma membrana de nitrocelulose *Amersham Protean Premium* 0,45 μm NC (*GE Healthcare*) em tampão 0,048 mol L^{-1} de tris, 0,04 mol L^{-1} de glicina e 20% de metanol (v/v). O sistema foi montado²³ 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 acrescido de 0,05% (v/v) Tween-20) por 4 h a 25 °C. Essas tiras foram lavadas 3 vezes com PBST por 5 min. Posteriormente, foram incubadas com IgG policlonal anti-cinomose provenientes de soros caninos com suspeita de cinomose, na diluição de 1:25, IgG policlonal anti-cinomose produzido em coelho na diluição 1:25, IgG policlonal anti-cinomose produzido em camundongo (*Rhea Biotech*) na diluição 1:25, IgG

monoclonal anti-cinomose produzido em camundongo (*Rhea Biotech*) na diluição 1:25. Como controle negativo, 14 tiras foram incubadas com soro de cães possivelmente saudáveis na diluição 1:25.

As diluições foram definidas com base em experimentos prévios analisando o melhor sinal no ensaio de *immunoblotting* (dados não mostrados). 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 cão produzido em coelho (*Sigma*), anti-IgG de coelho produzido em cabra (*Sigma*), anti-IgG de camundongo produzido em coelho (*RHEA*) e anti-IgG de cão produzido em coelho (*Sigma*), respectivamente, conjugados com peroxidase, diluídos na proporção 1:500 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 µL de água oxigenada (30% v/v). Após o aparecimento das bandas, a reação foi interrompida com água deionizada.

2.4 Resultados e discussão

2.4.1 Purificação do antígeno da cinomose

Para este estudo, a extração das proteínas do antígeno total foi realizada por precipitação com sulfato de amônio, metodologia bastante utilizada para antígenos e imunoglobulinas.

Desse modo, o precipitado foi lavado com uma solução de sulfato de amônio 40% para remoção de possíveis resíduos que foram carregados para o precipitado, mas que apresentem dissolução diferenciada na solução de lavagem. Cabe salientar que a concentração de 40% foi adicionada para impedir a solubilização das proteínas presentes no *pellet* no processo de lavagem. O *pellet* foi então dissolvido em água e concentrado em membrana semipermeável concentrador VivaSpin 3 kDa (*GE Healthcare*) tanto para diminuição do volume como remoção do sal residual.

Posteriormente, o extrato de proteínas concentrado foi submetido a três etapas de precipitação, com os reagentes: acetona-etanol (1:1 v/v); 10% de TCA e acetona (9:1 v/v). Essas etapas de precipitação tiveram como finalidade remover as proteínas da solução, deixando as impurezas e os sais presentes, solúveis, permitindo a separação desses interferentes por centrifugação.

A integridade das proteínas extraídas foi analisada por eletroforese em gel com 12,5% de acrilamida. Os perfis eletroforéticos dos extratos proteicos mostraram-se semelhantes (Figura 4). A eficiência da etapa de limpeza foi comparada com um extrato proteico tido como referência, já utilizado anteriormente pela empresa ParteCurae.

Para melhorar a eficiência do processo de limpeza das proteínas totais, o protocolo por sulfato de amônio foi modificado com a adição de etapas de precipitação e lavagem com diferentes solventes orgânicos (10% TCA em acetona/etanol gelada; acetona gelada) na proporção de 1:10 (proteína/solvente). A eficiência da precipitação é resultante da interação entre diversos fatores como o pH e solubilidade do precipitante, concentração e características físico-químicas das proteínas, temperatura, entre outros.²⁴

Figura 4. Perfil eletroforético em SDS-PAGE 12,5% de proteínas obtidas do extrato total de VCC (após a etapa de limpeza). PB – Padrão de baixa massa molecular. Canaleta 1: 10 μ L da amostra. Canaleta 2: 7 μ L da amostra. Canaleta 3: 5 μ L da amostra. Canaleta 4: 3 μ L. Canaleta 5: Referência 10 μ L. Canaleta 6: Referência 5 μ L e Canaleta 7: Referência 3 μ L.

Fonte: Autoria Própria

Considerando que um dos objetivos da visualização adequada do perfil proteico em gel é a transferência das proteínas para uma membrana de nitrocelulose, a concentração e a qualidade das proteínas é um fator limitante para a eficiência da eletrotransferência para a membrana. Além disso, observando o perfil eletroforético, foi possível verificar uma banda de maior intensidade em todas as diluições avaliadas e que pode corresponder à hemaglutinina, no entanto, há albumina (66 kDa) no extrato proteico proveniente do meio de cultura utilizado (DMEM suplementado com soro fetal bovino). Pesquisas realizadas até o momento têm utilizado os genes dessa glicoproteína, hemaglutinina (H ou HA) e de outra de fusão (F) do VCC para a produção de vacinas recombinantes, devido à importância dessas proteínas de superfície, que permitem a penetração do vírus pela membrana celular das células do hospedeiro e consequentemente o desenvolvimento da infecção.²⁵ Assim, observando o perfil eletroforético do *pool* de antígenos, considerou-se que a purificação foi satisfatória. A partir desse resultado, realizou-se o ensaio de avaliação do complexo antígeno-anticorpo, obtido pela técnica de *immunoblotting*.

2.4.2 Ensaio de *immunoblotting*

O *immunoblotting* foi realizado com o intuito de detectar quais as proteínas do *pool* de antígeno VCC poderiam ser consideradas imunogênicas e que, portanto, fortes candidatas no desenvolvimento do anticorpo monoclonal (IgG anti-VCC). O uso de anticorpos monoclonais tende a aumentar a especificidade dos testes imunocromatográficos, característica importante para o diagnóstico de doenças. Para tanto, foi realizado um ensaio comparando-se amostras sadias e infectadas com o vírus da cinomose providas da cultura de célula VERO e de soro de cães diagnosticados clinicamente.

Os anticorpos mono e policlonais, produzidos pela Empresa *Rhea Biotech*, foram avaliados qualitativamente por *immunoblotting* contra amostras de antígenos purificados, a partir do lisado de células VERO contendo o VCC, no qual apresentaram um elevado número de bandas, com padrão de perfil entre 60 a 8 kDa (Figura 5). As bandas mais proeminentes presentes nas amostras positivas (canaletas de 1 a 4) tiveram massas moleculares inferiores a 20 kDa. Os anticorpos (diluição 1:25), foram capazes de reconhecer frações antigênicas em todas as amostras positivas testadas. Este resultado demonstra que houve reatividade dos anticorpos policlonais ou monoclonais anti-VCC frente às proteínas totais extraídas do antígeno.

Figura 5. Detecção de proteínas imunogênicas por *immunoblotting* usando anticorpos marcados com peroxidase e revelados com DAB (diaminobenzidina). CB: padrão de massa molecular para *Immunoblotting* Colorburst (Sigma); 1. Tira incubada com anticorpo anti-VCC policlonal provindo de soro de cão doente na diluição 1:25; 2. Tira incubada com anticorpo anti-VCC policlonal produzido em coelho na diluição 1:25; 3. Tira incubada com anticorpo anti-VCC policlonal produzido em camundongo na diluição 1:25 e 4. Tira incubada com anticorpo anti-VCC monoclonal produzido em camundongo na diluição 1:25.

Fonte: Autoria Própria.

Outro aspecto a ser considerado é a semelhança do perfil de proteínas imunogênicas detectadas com anticorpos IgG anti-cinomose mono e policlonal, provando desse modo a ineficiência na etapa de seleção de um clone mais específico durante a produção do anticorpo monoclonal (Figura 5).

Neste ensaio também foram estudadas 14 amostras de soro de animais clinicamente saudáveis, gentilmente cedidas pela Clínica Veterinária São Francisco de Assis - São Carlos. Amostras consideradas negativas foram obtidas de animais com diagnóstico clínico saudável, porém não passaram por exame laboratorial para certificar a presença e/ou ausência do vírus da cinomose ou a alta concentração de IgG anti-

cinomose. Comparando-se o perfil obtido da amostra 1 (amostra positiva) com as clinicamente sadias foi observado a ausência de bandas nas amostras 4, 11 a 15. Entretanto, as amostras 5 e 6 foram consideradas reagentes devido ao perfil e a intensidade semelhantes às do soro infectado com bandas intensas entre 45 a 8 kDa (destacadas pelas setas na Figura 6). Ressalta-se que a maioria dos anticorpos monoclonais comerciais para VCC reconhecem normalmente uma das 6 proteínas estruturais: NP (proteína do nucleocapsídeo), P (fosfoproteína), M (proteína da matriz), F (proteína de fusão), H (hemaglutinina) e L (grande proteína). Informações obtidas em bancos de dados público mundial (UNIPROT)²⁶ forneceram massas moleculares das proteínas estruturais entre 37,76 a 72,95 kDa, especificamente: NP (58,139 kDa), P (54,749 kDa), M (37,768 kDa), F (72,95 kDa) e H (67,98 kDa).

Figura 6 - Detecção de proteínas imunogênicas por *immunoblotting* usando anticorpos marcados com peroxidase e revelados com DAB (diaminobenzidina). CB: padrão de massa molecular para *Immunoblotting* Colorburst (Sigma); **1**. Tira incubada com anticorpo anti-VCC policlonal provindo de soro de cão doente na diluição 1:25; **2-15**. Tiras incubadas com soro de cães clinicamente sadios na diluição 1:25.

Fonte: Autoria Própria.

Frente aos resultados obtidos em relação a eficiência dos anticorpos produzidos, experimentos foram realizados para avaliar a sua funcionalidade através da análise do perfil da cultura de células VERO sem a infecção pelo vírus da cinomose como controle negativo. Uma lise celular também foi realizada, na presença ou ausência de coquetel inibidor de protease, para avaliar o nível de degradação das proteínas devido a ação de proteases. Nesses experimentos, utilizou-se o mesmo protocolo descrito anteriormente, com ciclos de congelamento e descongelamento para a lise celular. O procedimento para a adição de coquetel inibidor de protease (*Protease Inhibitor Mix- GE Healthcare*) seguiu-se de acordo com o descrito pelo fabricante. As interações dos extratos proteicos foram avaliadas por ensaio de *immunoblotting* (Figura 7).

Figura 7. Detecção de proteínas imunogênicas de amostras de célula VERO por *Immunoblotting*. CB. Padrão de massa molecular ColorBurst (*Sigma*). 1. Extrato de célula VERO não infectada com o VCC, sem adição de inibidor de protease no momento da lise; 2. Extrato de célula VERO não infectada com o VCC, com adição de inibidor de protease no momento da lise; 3. Extrato de célula VERO infectada com VCC, sem inibidor de protease no momento da lise. Todas as tiras foram incubadas com IgG monoclonal anti-cinomose produzido em camundongo na diluição 1:25 (*RheaBiotech*) e anti-IgG de camundongo produzido em coelho conjugado com peroxidase (*Sigma*) na diluição de 1:500. As tiras foram reveladas com DAB (*Sigma*).

Fonte: Autoria Própria

Pela Figura 7, observou-se que todas as amostras analisadas apresentaram o mesmo perfil de bandas, principalmente entre 100 a 30 kDa e acima de 100 kDa, ou seja, não houve diferença nas amostras sem infecção (controle negativo, canaletas 1 e 2) comparado a amostra contendo o VCC inoculado na cultura de células VERO. Dessa forma, concluiu-se que o anticorpo produzido não mostrou especificidade para o VCC devido a uma falha de seleção do clone no processo de confecção do anticorpo monoclonal, ou mesmo pela falta de purificação ou isolamento da proteína específica do VCC. Este resultado demonstrou que os anticorpos mono e policlonais foram produzidos contra as proteínas da célula VERO, que se encontravam em concentrações maiores que do VCC, o que leva a compreender o perfil similar do controle negativo e do controle positivo no ensaio de *immunoblotting*.

A partir desse resultado, novos anticorpos monoclonais anti-cinomose produzidos em camundongo (*Novus biologycal*) foram avaliados com extratos proteicos provenientes da cultura de célula VERO (controle negativo) e da vacina contra cinomose (*BioVet*). O resultado obtido se encontra na Figura 8.

Nos experimentos utilizando o anticorpo monoclonal anti-cinomose produzido em camundongo adquirido da empresa *Novus Biologycal*, foram adotadas as diluições 1:50, com base em ensaios prévios que apresentaram o melhor sinal no ensaio de *Immunoblotting* (dados não mostrados).

Figura 8. Ensaio de *immunoblotting* com anti-IgG de camundongo produzido em coelho conjugado com peroxidase *Sigma Aldrich* na diluição 1:500 + DAB. **PB.** Padrão de baixa massa molecular. **1.** Antígeno da cinomose proveniente de célula VERO infectada imobilizado na membrana, incubado com anticorpo monoclonal anti-cinomose produzido em camundongo (*Novus biologycal*) na diluição 1:50. **2.** Vacina da cinomose imobilizada na membrana, incubado com anticorpo monoclonal anti-cinomose produzido em camundongo (*Novus biologycal*) na diluição 1:50. Imagem com brilho e contraste alterados: brilho +20 e contraste -20.

Fonte: Autoria Própria.

Como é possível observar na Figura 8, ao reagir o IgG monoclonal anti-cinomose com o extrato proteico oriundo da cultura de células VERO, não foi observado reatividade com o anticorpo avaliado, mostrando que as proteínas presentes nesse extrato (controle negativo) são quase exclusivamente constituintes da célula VERO.

Em comparação, como controle positivo foi utilizado uma vacina contra cinomose (*Biovet*), obtida de extratos de vírus purificados. Novamente, a reatividade foi avaliada pela incubação da amostra viral com o soro monoclonal anti-VCC (*Novus Biologycal*), na diluição de 1:25, reconhecendo frações antigênicas que variaram de 66 a 30 kDa, sendo as mais intensas com valores aproximados de massas moleculares 55,6 kDa, 45 kDa, 37,5 kDa, 33,7 kDa e 30 kDa. Esse resultado mostrou que houve reatividade do

anticorpo com a amostra de vacina avaliada, porém é sabido que esse anticorpo reconhece apenas quatro proteínas de massas 76 kDa, 68 kDa, 54 kDa e 32 kDa. Isso pode significar que a vacina utilizada se encontra em estado de degradação. Para isso, foi feita uma análise em SDS-PAGE 12,5% para avaliar a integridade das proteínas virais contidas na vacina (Figura 9).

Figura 9. Perfil eletroforético SDS-PAGE 12,5% de vacina de cinomose em degradação. Gel corado com Comassie Brilliant Blue. **PB.** Padrão de baixa massa molecular. **1.** Amostra de vacina de cinomose em degradação. Brilho da imagem alterado para +20%.

Fonte: Autoria Própria.

O perfil eletroforético da vacina contra cinomose mostrou três bandas bem definidas, com massas de 66, 56 e 30 kDa, que são compatíveis com as proteínas H, NP e P e M, respectivamente. Comparando-o com o resultado obtido pelo *immunoblotting* (Figura 8), observou-se a reatividade de duas massas proteicas menores frente ao anticorpo monoclonal anti-VCC avaliado. Entretanto, verificou-se também a presença de um rastro de manchas ou “*smear*” indicando a ocorrência de degradação de proteínas. Frente a esse resultado, buscou-se adquirir uma nova alíquota da vacina anti-cinomose. Diversos fornecedores foram consultados, no

entanto, as vacinas disponíveis comercialmente abrangem outras doenças, como a V8 e V10 que imunizam contra cinomose, hepatite contagiosa, adenovirose, parvovirose, parainfluenza, leptospirose e coronavirose.²⁷ Essa quantidade de cepas diferentes podem dificultar a sensibilidade e a confecção dos testes específicos, já que o intuito inicial consistia na imobilização das proteínas virais da cinomose na região de captura da linha teste para a detecção de anticorpos IgG nas amostras de sangue de animais infectados.

Dessa forma, a estratégia abordada foi adquirir proteínas recombinantes virais para a confecção da linha teste dos kits diagnósticos para cinomose. Essa estratégia é bastante interessante, visto que permite alterar as concentrações de cada proteína de acordo com a sua imunogenicidade já que apresentam diferentes respostas frente a presença de anticorpos. Desse modo, os ajustes desses sinais impedirão que o teste apresente resultados falso positivos para cães vacinados ou falso negativos para baixa resposta imune do organismo.

Porém, até o presente momento, as proteínas recombinantes selecionadas ainda não foram finalizadas e/ou entregues. Desse modo, optou-se por utilizar, nos ensaios de padronização da plataforma, os pares de antígeno e anticorpo que já estavam disponíveis no laboratório. Os parâmetros avaliados, descritos no próximo capítulo foram: a confecção de conjugados e sua liberação, a imobilização nas linhas teste e controle em papel de filtro Whatman nº 1, bloqueio do Whatman nº 1 e avaliação e transposição da plataforma tradicional para uma plataforma confeccionada em papel.

*Capítulo 3: O kit – Desenvolvimento da plataforma
imunocromatográfica usando papel de filtro*

O kit diagnóstico proposto, baseado em uma plataforma imunocromatográfica, é constituído de diferentes regiões que consistem em diferentes tipos de papéis, membranas e fibras, que proporcionam a migração dos constituintes do teste e posterior detecção do analíto, o qual é visualizado através da presença de agente cromogênico, um conjugado de nanopartículas de ouro com anticorpos.

Neste capítulo, as regiões do teste serão tratadas separadamente para otimizar seu funcionamento, no entanto, este só pode ser avaliado em conjunto, dessa forma, todas as etapas envolvem a confecção da plataforma completa, modificando uma variável por vez para se chegar ao melhor resultado. Este trabalho, propõe a substituição da membrana de nitrocelulose presente em uma plataforma convencional, pelo o papel de filtro Whatman nº1

3.1 Região de detecção.

A região de detecção, também conhecida como de captura, tem sido a mais laboriosa na etapa de padronização, uma vez que o objetivo é obter uma alternativa inovadora e de baixo custo em relação as disponíveis comercialmente. A característica fundamental é que haja uma ligação estável e irreversível dos reagentes (anticorpos ou antígenos), depositados nas linhas teste e controle, tanto com o papel como o analíto da amostra. Aplicando-se os fundamentos da imunocromatografia no teste proposto, foi decidido confeccionar um kit de detecção de anticorpos anti-cinomose. Dessa forma, futuramente, a linha teste será composta de proteínas recombinantes do vírus da cinomose, que foram adquiridas pela empresa ParteCurae, mas que se encontram em fase de síntese e expressão, e a linha controle composta por anticorpo IgG policlonal.

Em sistemas imunocromatográficos, a membrana de nitrocelulose tem sido a mais utilizada na região de captura, devido a ligação eletrostática através da forte interação do dipolo dos ésteres de nitrato da nitrocelulose com os das ligações peptídicas das proteínas.²⁸ Desse modo, o uso de membranas de nitrocelulose tem facilitado essa etapa uma vez que essa já vem ativada, havendo apenas a necessidade de bloqueio

dos sítios inespecíficos que não foram ocupados. No entanto, nesse trabalho, a proposta inovadora é de substituir as regiões pelo papel de filtro Whatman nº 1, a fim de impactar ainda mais no custo da plataforma. Esse é um grande desafio, pois o papel de filtro Whatman nº 1 tem estrutura mais inerte que a nitrocelulose, e necessita ser funcionalizado antes da imobilização das proteínas e anticorpos.

3.1.1 Metodologia aplicada à região de detecção utilizando papel de filtro Whatman nº 1 (*GE Healthcare*)

Tiras de papel Whatman nº 1 foram cortadas na dimensão de 70 × 5 mm, de modo a manter o mesmo tamanho dos testes comerciais, tornando possível a divisão das regiões na proporção das plataformas originais. A seguir estão descritas diferentes metodologias aplicadas, para permitir a melhor imobilização na região de captura, resultando em maior quantidade de material imobilizado, e consequentemente maximização do sinal gerado.

3.1.1.1 Tratamento da região de detecção com periodato de sódio (NaIO_4)

Inicialmente, as tiras cortadas tiveram suas regiões teste e controle marcadas a fim de delimitar tais regiões de deposição. Em cada região, adicionou-se 10 μL de uma solução 0,5 mol L^{-1} de NaIO_4 , e manteve-se as tiras por 30 min a 25 °C. Decorrido esse tempo, 2 etapas de lavagem com 10 μL de água deionizada foram feitas em cada região e secas no verso com outro papel filtro. Após, foram aplicados 3 μL de anticorpo IgG anti-VERO produzido em camundongo a 2,0 mg mL^{-1} na linha controle e 3 μL de proteínas provenientes do pool de antígenos extraído de uma cultura de célula VERO a 67 mg mL^{-1} na linha teste, sendo que a aplicação foi feita 1 μL por vez em cada região, para não haver espalhamento extenso. Após a adição, incubou-se 30 min a 25 °C e o excesso retirado com 10 μL de água deionizada.

Como a ligação covalente já havia sido estabelecida, o papel passou por uma etapa de redução, para estabilização da ligação, através da formação de amina

secundária. Para essa etapa, foram adicionados 10 μL de solução 0,025 mol L^{-1} de NaBH_3 em cada região. Em seguida, as tiras foram imersas em solução de bloqueio contendo 1% de BSA em PBS 0,01 mol L^{-1} e pH 7,4. As tiras foram lavadas com PBS acrescido de Tween-20 0,05% e secas a 25 °C.²⁹

3.1.1.2 Tratamento da região de detecção com divinilsulfona (DVS)

As tiras de papel foram imersas em uma solução de divinilsulfona 10% (v/v) em tampão carbonato 0,1 mol L^{-1} , pH 11 por 2 h. Decorrido esse tempo, as tiras foram lavadas com água deionizada por 3 vezes e secas por mais 2 h a 25 °C. Em seguida foram adicionados 2 μL de anticorpo IgG anti-VERO produzido em camundongo (*Rhea Biotech*) a 2 mg mL^{-1} e incubou-se por 18 h a 25 °C. As tiras foram bloqueadas com PBST e 1% (m/v) de BSA e secas por 2 h a 25 °C.³⁰

3.1.1.3 Tratamento da região de detecção com tampão carbonato 0,1 e 0,2 mol L^{-1} em pH 11

Outro tratamento utilizado, para a imobilização do anticorpo na tira, foi o uso somente do tampão carbonato. Para isso, tiras de papel foram sensibilizadas pela imersão por 2 h em tampão carbonato 0,1 mol L^{-1} e 0,2 mol L^{-1} , pH 11. Após secagem a 25 °C, 3 μL de anticorpo IgG anti-cinomose produzido em camundongo (*Rhea Biotech*) a 2,0 mg mL^{-1} foram imobilizados, incubados em estufa à 40 °C por 1 h e bloqueados em solução de PBST e BSA.³⁰

3.1.2 Metodologia aplicada à região da membrana de nitrocelulose

A região de detecção composta por membrana de nitrocelulose foi utilizada apenas quando se desejava padronizar a região do *conjugate pad*. Para tal finalidade,

foi utilizada a membrana de nitrocelulose Immunopore FP (*GE Healthcare*), que é uma membrana de fluxo médio.

Cortou-se a membrana com dimensões de 25 × 5 mm e depositou-se 1 µL de anticorpo IgG anti-VERO produzido em camundongo a 2 mg mL⁻¹ na linha controle. Secou-se em estufa de 37 – 40 °C e bloqueou-se com uma solução composta de tampão PBS acrescido de BSA. Secou-se a membrana novamente em estufa e montou-se a plataforma.

3.2. Região de deposição do conjugado (*conjugate pad*)

3.2.1. O conjugado

O conjugado é constituído de nanopartículas de ouro recobertas por biomoléculas. Nos testes imunocromatográficos, a biomolécula pode ser anticorpo primário (quando o teste detecta antígeno) ou secundário (quando o teste detecta anticorpo). Neste trabalho, optou-se por desenvolver um teste para a detecção de anticorpo, e a biomolécula utilizada no conjugado é um anticorpo secundário.

Como citado anteriormente, existem dois tipos de conjugação: por adsorção ou interação física e por ligação covalente ou interação química. Nesse trabalho, a conjugação foi realizada por adsorção física devido a praticidade e simplicidade do protocolo³¹, bem como do adequado desempenho quanto à migração e ao sinal das linhas de captura.

3.2.2. Processo de conjugação

À uma solução coloidal de nanopartículas de ouro de 10 nm (*Sigma*), com densidade óptica igual a 1, foi adicionado anticorpos secundários (anti-IgG de camundongo produzido em coelho (*Sigma*)) na concentração final de 0,2 mg mL⁻¹. Posteriormente, a solução foi então incubada por 1 h e bloqueada com adição de PBS acrescido de BSA por 30 min. O conjugado foi centrifugado por 30 min à 14.000 × *g*,

seu sobrenadante removido e o *pellet* formado ressuspendido em um volume 10 vezes menor que o inicial. Para cada teste, 5 μ L da solução de conjugado foi depositada na região do *conjugate pad*.

3.2.3 Região *conjugate pad*

A região denominada *conjugate pad* apresenta como principal função a liberação adequada das partículas detectoras, no caso AuNPs conjugadas, para a membrana. Ou seja, à solução contendo o analíto passará por essa região e fará o carreamento do conjugado depositado sobre a mesma. Devido as características exigidas, o material poroso normalmente utilizado são fibras de celulose, vidro ou plásticos (tais como poliéster, polipropileno ou polietileno), com espessura fina (exemplo, fibras de vidro de 100 a 500 μ m).²⁸

Para comparação, inicialmente foram avaliadas nessa região o uso de fibras de vidro (*Standard 14, GE Healthcare*), tratadas e bloqueadas para que as mesmas permaneçam inertes, evitando as interações do conjugado depositado com o suporte sólido. Existem duas possibilidades para o tratamento e confecção dessa região do teste: a adição de uma solução de tratamento à fibra e posterior secagem, ou a adição da solução de tratamento diretamente ao conjugado final e deposição do conjugado à fibra e secagem.

Para este trabalho foram avaliados diferentes protocolos de tratamento do *conjugate pad*, observando-se sempre a eficiência de liberação das AuNPs e o estágio de agregação, que cada um desses tratamentos pode ou não causar, aos conjugados. Primeiramente avaliou-se os protocolos aplicados à membrana de fibra de vidro *Standard 14*. A partir desses resultados, os melhores protocolos foram avaliados em papel de filtro Whatman nº 1.

3.2.3.1 Tratamento de *conjugate pad* contendo sacarose

Neste protocolo, a região do *conjugate pad* foi submetida ao tratamento no momento da deposição do conjugado. Na etapa final de conjugação, o sobrenadante foi removido e o conjugado, ressuspendido em solução de 5% sacarose, 1% de BSA, 0,5% de Tween-20 em PBS 0,01 mol L⁻¹ pH 7,4. Esse conjugado foi então adicionado ao *conjugate pad* sem tratamento e seco a 25 °C, com umidade reduzida. A solução utilizada neste experimento tem como função estabilizar o conjugado e bloqueá-lo, impedindo a interação com o suporte.³²

3.2.3.2 Tratamento de *conjugate pad* contendo leite desnatado

Os *conjugate pads* foram imersos em solução contendo 20% de sacarose em PBST e 5% de leite desnatado e secos em estufa à 37 – 40 °C.³³ A solução contendo o conjugado foi concentrada 10 vezes antes da deposição no *conjugate pad* e este seco a 25 °C, com umidade reduzida.

3.2.3.3 Tratamento de *conjugate pad* contendo PEG 6000

Neste tratamento, os *conjugate pads* foram imersos em solução de 1% BSA, 0,5% de Tween-20, 3,3% de PEG 6000 e 20% de sacarose em PBS e mantidos em estufa à 37 – 40 °C.³⁴ O conjugado foi concentrado 10 vezes, depositado no *conjugate pad* e seco a 25 °C, com umidade reduzida.

3.2.3.4 Tratamento de *conjugate pad* contendo Dextrana

A região do *conjugate pad* foi imersa em solução contendo 10% de sacarose, 0,5% de Tween-20, 5% de dextrana e 0,05% de azida sódica em água deionizada e secos em estufa à 37 – 40 °C.³⁵ O conjugado finalizado e concentrado 10 vezes foi depositado nesse *conjugate pad* e seco a 25 °C, com umidade reduzida.

3.2.3.5 Tratamento de *conjugate pad* contendo tampão Tris-HCl pH 7,5

Os *conjugate pads* foram imersos em solução de 5% de sacarose, 0,5% de BSA em Tris-HCl 2,5 mM e pH 7,5, e secos em estufa à 37 – 40 °C.³⁶ O conjugado finalizado e concentrado 10 vezes foi depositado nesse *conjugate pad* e seco a 25 °C com umidade reduzida.

3.3 Sample Pad

O *sample pad* é a região responsável por receber a amostra e, se necessário, mudar algumas de suas propriedades, através da deposição de compostos que possam ser transferidos para a amostra e permitam que o analíto seja liberado com maior eficiência. Como tratamento da amostra, o *sample pad* pode atuar na filtragem de células ou partículas (como amostras de sangue ou urina), modificando o pH para que seja compatível com o da plataforma ou, até mesmo, ligando compostos na amostra como surfactantes para deixá-la mais fluida.

Podem ser utilizadas tanto a fibra de vidro quanto materiais de origem celulósica, variando a sua gramatura de acordo com a necessidade de retenção das partes que compõem a amostra. Neste trabalho, não foram avaliados os diferentes *sample pads* pois ainda não se atingiu a etapa de avaliação das amostras reais.¹⁵

3.4 Absorbent pad

A região do *absorvente pad* é responsável por absorver os reagentes e analíto que migraram pelos poros da membrana, mantendo o fluxo contínuo por capilaridade. A partir da inserção de um absorvente na extremidade da plataforma, uma quantidade maior de amostra pode ser utilizada, favorecendo a sensibilidade do teste.³⁷ Dessa forma, para as plataformas convencionais desse trabalho, utilizou-se o papel de filtro CF5 (*GE Healthcare*). Já para as plataformas em Whatman nº 1, utilizou-se como artifício, o acréscimo de 10 mm no comprimento da tira.

3.5 Resultados e Discussão

3.5.1 Região do *Conjugate Pad*

A região do *conjugate pad* tem como finalidade estabilizar as partículas do conjugado e ao mesmo tempo impedir a retenção das partículas nas fibras de vidro. Para que isto aconteça é necessária uma condição ótima de pH, bem como a presença de agentes bloqueadores e/ou agentes surfactantes. O conjugado é o responsável pela sinalização do teste, indicando o resultado visual, positivo ou negativo. Caso as condições do *conjugate pad* não estejam adequadas, poderá haver agregação das partículas sem que haja liberação do sinalizador, tornando o teste ineficiente ou inválido.

As nanopartículas de ouro (AuNPs), utilizadas nos conjugados, são muito vantajosas como sinalizadoras ou cromógenos ou apresentarem um coeficiente de absorvidade molar maior que corantes orgânicos. Por exemplo, enquanto as nanopartículas apresentam um coeficiente de absorvidade molar variando da ordem de grandeza de 10^7 a 10^{11} L mol⁻¹ cm⁻¹, os corantes têm seu coeficiente de absorvidade molar variando na ordem de grandeza de 10^4 a 10^5 L mol⁻¹ cm⁻¹.^{38,39,40} Além de terem cores mais intensas que os corantes, as nano partículas ainda possuem área superficial maior, permitindo que sejam feitas modificações em suas superfícies, funcionalizando-as. No entanto, essas funcionalizações devem ser feitas de tal forma que não modifiquem demais suas características, caso contrário, haverá agregação, e consequentemente perda de função e de intensidade de cor.⁴¹ Sabendo de todas essas características, fica evidente a importância da padronização dessa região em um teste imunocromatográfico.

A etapa de conjugação utilizada neste trabalho foi bastante simples, a qual consiste de interações eletrostáticas entre as cargas negativas das AuNPs e as cargas positivas da proteína (o anticorpo). Um esquema da conjugação está representado na Figura 10.

Figura 10. Representação esquemática de uma conjugação por adsorção entre a nanopartícula de ouro e uma densidade de carga positiva, nesse caso o anticorpo.

Fonte: TAM, M.E.A. et al. *Structure and function of nanoparticle–protein conjugates*. *Biomedical Materials*. v. 3. p.3. 2008.

Após interação entre as AuNPs com os anticorpos, é possível que hajam espaços na superfície das nanopartículas que não tenham sido recobertos com anticorpos. Para isso, proteínas menores são utilizadas para ocupar essas lacunas, como BSA, caseína, ovalbumina, entre outras moléculas, fazendo com que o conjugado esteja completamente recoberto, impedindo desse modo, reações inespecíficas durante as próximas etapas. Além disso, o conjugado e o *conjugate pad* necessitam de um tratamento que aumente a estabilidade e a liberação das partículas, para que elas sejam completamente lixiviadas para a zona de detecção. Neste trabalho foram comparados 5 tipos de tratamento aplicados no conjugado ou na região do *conjugate pad* (PEG, dextrana, sacarose, leite desnatado e Tris-HCl).

Para melhor desempenho na liberação do conjugado utilizou-se inicialmente os *conjugate pads* constituídos de fibra de vidro *Standard 14 (GE Healthcare)*, e os mais eficientes foram repetidos em papel de filtro Whatman nº1. Os resultados obtidos desses procedimentos se encontram na Figura 11.

Figura 11. Avaliação dos diferentes protocolos de tratamento de conjugado/*conjugate pad*. Acima de cada par de dispositivos especifica-se os reagentes distintos de cada protocolo. No conjugado: AuNPs (10 nm - Sigma) e Anti-IgG de camundongo produzido em coelho.

Fonte: Autoria Própria.

Comparando os protocolos avaliados nos tratamentos do conjugado/*conjugate pad*, foi possível selecionar os que melhor apresentaram as características desejadas, considerando a lixiviação como um dos fatores mais importantes. O protocolo onde o tampão Tris-HCl foi aplicado foi o que mais reteve os conjugados, podendo ser observado uma coloração mais escura na região depositada (vide setas na Figura 11). Já o protocolo que utiliza leite desnatado, não mostrou um fluxo uniforme na membrana, mesmo apresentando uma liberação aceitável. Entretanto, os tratamentos com polietilenoglicol (PEG), dextrana e sacarose mostraram-se equivalentes, com boa liberação do conjugado para a membrana. Ressalta-se que foi descartado, em princípio, o tratamento com dextrana devido ao alto custo desse reagente, um polissacarídeo de glicose produzido por bactérias. Dessa forma, a continuidade desse ensaio foi pela

reprodução no papel de filtro Whatman nº 1 dos tratamentos com sacarose e PEG (Figura 12).

Figura 12. Comparação da eficiência de liberação de conjugado entre fibra de vidro Standard 14 e papel de filtro celulósico Whatman nº 1. **A.** Tratamento do *conjugate pad* utilizando solução com 1% BSA, 0,5% de Tween-20, 3,3% de PEG 6000 e 20% de sacarose em PBS. **B.** Tratamento do conjugado utilizando solução com 5% sacarose, 1% de BSA, 0,5% de Tween-20 em PBS.

Fonte: Autoria Própria.

As fibras de vidro, utilizadas como suportes sólidos em plataformas convencionais, apresentam um tipo de malha mais aberta e inerte, devido à sua estrutura e constituição sendo, portanto, bastante adequada quanto a baixa retenção do conjugado. Em relação ao papel Whatman nº 1, constituído somente por celulose, possui na sua estrutura grupamentos hidroxilas que devem ser bloqueados para impedir a interação do conjugado. Além disso, por apresentar uma malha mais fechada que a fibra de vidro, o papel necessita de tratamento para aumentar o processo de

liberação. No entanto, quando submetido aos tratamentos em tampão contendo PEG e sacarose, o papel Whatman, mostrou-se eficiente em ser utilizado como *conjugate pad*.

Dentre os tratamentos empregados, o otimizado nos testes foi o que possuía a presença de sacarose devido a sua simplicidade e de consistir somente uma etapa de troca de solução do conjugado no final do processo de conjugação. O tratamento com adição de PEG mostrou-se também eficiente na lixiviação do conjugado, porém necessita de etapas de incubação e secagem do papel além de utilizar uma quantidade maior de reagentes.

3.5.2 Região de detecção

A plataforma imunocromatográfica oferece uma análise qualitativa de baixo custo e rápida (em média 20 min). Dentre os componentes de uma plataforma, três apresentam grande impacto no custo operacional sendo eles: anticorpos, partículas de ouro e a membrana de nitrocelulose. Como alternativa para diminuir o custo da plataforma (Anexo), optou-se por desenvolver um teste imunocromatográfico substituindo os papéis e a membrana de nitrocelulose pelo papel de filtro Whatman nº 1. Devido a sua natureza celulósica, não apresenta reatividade comparada a nitrocelulose das membranas utilizadas na plataforma convencional. Para isso, o papel Whatman nº 1 deve ser tratado para que se torne possível a imobilização das regiões de captura, aumentando a sensibilidade do sinal, e se assemelhando em função à membrana de nitrocelulose.

3.5.2.1 Tratamento do Whatman nº 1 com periodato de sódio

O primeiro tratamento avaliado neste trabalho foi com periodato de sódio, o qual promove a oxidação do anel da celulose, transformando os grupamentos hidroxila em aldeídos.²⁹ Ao entrar em contato com o anticorpo, o nitrogênio da amina se liga à cadeia de açúcar covalentemente e os grupos aldeídos sobressalentes são reduzidos pela adição de borohidreto de sódio. O esquema representativo do tratamento com periodato de sódio se encontra na Figura 13.

Figura 13. Representação esquemática das modificações na estrutura e reatividade da celulose. 1. oxidação da celulose com periodato de sódio, 2. ligação covalente do anticorpo na fibra do papel, 3. redução com boroidreto de sódio, 4. produto final.

Fonte: Adaptação de Postigo 2016 a partir de WANG, S. et. al. 2012 p. 3823.

Após efetuar o tratamento no papel Whatman nº 1, os conjugados foram aplicados às tiras, na região do *conjugate pad*, e o fluxo capilar foi obtido pela aplicação de tampão PBS 0,01 mol L⁻¹ pH 7,4. As Figuras 14 e 15, mostram as tiras antes e depois da corrida.

Figura 14. Tiras de papel Whatman nº 1 oxidadas com periodato de sódio, sensibilizadas com anticorpo e reduzidas com boroidreto de sódio. Na região teste: antígeno produzido em célula VERO. Na linha controle, IgG anti-VERO produzido em camundongo. No conjugado, AuNPs (10 nm) juntamente com Anti-IgG de camundongo produzido em coelho. Em todas as linhas testes, foram depositados IgG anti-VERO produzido em camundongo para eliminar a variável do fluxo do analito.

Fonte: Autoria Própria.

Figura 15. Tiras de papel Whatman nº 1 oxidadas com periodato de sódio, sensibilizadas com anticorpo e reduzidas com boroidreto de sódio. Na região teste: antígeno produzido em célula VERO. Na linha controle, IgG anti-VERO produzido em camundongo. No conjugado, AuNPs (10 nm) juntamente com Anti-IgG de camundongo produzido em coelho. A corrida do teste foi feita em fluxo vertical com tampão PBS para carreamento do conjugado de nanopartículas de ouro. Foram feitos apenas os controles positivos, onde foram depositados sobre a linha teste, IgG anti-VERO produzido em camundongo.

Fonte: Autoria Própria.

Observando o resultado obtido após a corrida, é possível notar que para os *microchips* impressos em cera, tanto os tratados com periodato de sódio, quanto os não tratados, apresentaram a deposição do conjugado nas bordas das regiões de captura. Ao corar as tiras não impressas em cera com o corante Ponceau S (Figura 16), um corante específico para proteínas, observa-se que a imobilização dos antígenos e anticorpos foi fraca, quase inexistente, dessa forma, todo aquele acúmulo de conjugados nas bordas das regiões de captura não foi devido à interação entre as moléculas do analito e do conjugado e sim à uma ausência de fluxo, que incapacitou o conjugado de continuar migrando e levou ao acúmulo observado na Figura 15.

Figura 16. Tira de papel Whatman nº 1 oxidadas com periodato de sódio, sensibilizadas com anticorpo e reduzidas com boroidreto de sódio. Na região teste: antígeno produzido em célula VERO. Na linha controle: IgG anti-VERO produzido em camundongo. No conjugado, AuNPs (10 nm) e Anti-IgG de camundongo produzido em coelho. Em todas as linhas testes, foram depositados IgG anti-VERO produzido em camundongo para eliminar a variável do fluxo do analito. A corrida do teste foi feita em fluxo vertical com tampão PBS para carregamento do conjugado de nanopartículas de ouro. Corada com Ponceau S após a corrida.

Fonte: Autoria Própria

Para confirmar se houve falta de carregamento do conjugado pelo *design* do *microchip*, o conjugado foi permeado por um teste sem a imobilização de anticorpos, apenas bloqueado (para evitar as interações inespecíficas) (Figura 17).

Figura 17. Permeação do conjugado por um *microchip* bloqueado com BSA 1%, sem a imobilização das regiões de captura, para avaliar a eficiência do *design* do microchip.

Fonte: Autoria Própria.

Ainda na Figura 17, a seta vermelha indica uma difusão do líquido além da barreira criada pela cera, na delimitação do canal. Isso ocorre devido ao fato de que o papel Whatman nº 1 para ser utilizado com a finalidade de membrana, deve passar por tratamentos que modifiquem a sua estrutura. No geral, esses tratamentos são feitos através de imersão e a cera, que delimita o canal, é removida, etapa à etapa, fazendo com que a impermeabilidade conferida ao *microchip* diminua. Além disso, o *design* do *microchip* impresso em cera se mostrou ineficiente, de forma que até mesmo um *microchip* sem a imobilização das linhas de captura, apresentou a deposição dos conjugados nas extremidades da região de captura. Dessa forma, optou-se por trabalhar com as plataformas de tira de papel Whatman nº 1 cortada, sem a delimitação de canais e zonas de captura.

3.5.2.2 Tratamento do Whatman nº 1 com divinilsulfona

Existem muitos reagentes que podem atuar na modificação da fibra da celulose e uma alternativa ao periodato de sódio é a divinilsulfona (DVS). A DVS, em pH 11), tem como propriedade a interação com o oxigênio do grupo hidroxila da glicose, que nesse pH é desprotonado, levando à uma modificação na cadeia pela interação das moléculas

de glicose do papel com a DVS. O esquema de ativação do papel com DVS se encontra na Figura 18.

Figura 18. Representação esquemática da alteração da cadeia de glicose na estrutura da celulose do papel Whatman nº1 pela ação da divinilsulfona em pH 11.

Fonte: YU, A *et. al.* Biofunctional Paper via Covalent Modification of Cellulose. Langmuir. 2012. p 11266.

A fim de avaliar o processo de imobilização pela atuação da DVS, utilizou-se apenas a região controle, no caso o anticorpo contra as proteínas da célula VERO (IgG anti-VERO produzido em camundongo (*RheaBiotech*)) para imobilização na tira. As tiras tratadas com DVS e com a região controle imobilizadas tiveram o conjugado depositado na região do *conjugate pad* e submetidas a fluxo vertical através de imersão, de uma das extremidades das tiras, em tampão PBS $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,4. Foram avaliadas tiras bloqueadas com BSA e sem BSA, apenas com PBST (Figura 19).

Figura 19. Tiras de papel Whatman nº 1 tratadas por 2 h de imersão em DVS em tampão carbonato e pH 11, bloqueadas com BSA e sem bloquear, apenas com PBST. Imobilizada apenas a região controle, composta de IgG anti-VERO produzido em camundongo. No conjugado, AuNPs 10 nm e anti-IgG de camundongo produzido em coelho. Corrida com fluxo vertical de tampão PBS. As setas indicam a região controle.

Fonte: Autoria Própria.

Observando a Figura 19, não é possível visualizar o aparecimento da região controle, devido à alta retenção do conjugado, ou à baixa imobilização de anticorpo na região de captura. As tiras foram então coradas com Ponceau S para identificar se houve a formação ou não da região controle (Figura 20).

Figura 20. Tiras de papel Whatman nº 1 tratadas por 2 h de imersão em DVS 10% em tampão carbonato e pH 11, boqueadas com BSA e sem bloquear, apenas com PBST. Imobilizada apenas a região controle, composta de IgG anti-VERO produzido em camundongo. No conjugado, AuNPs 10 nm e anti-IgG de camundongo produzido em coelho. Corrida com

fluxo vertical de tampão PBS. Tiras coradas com Ponceau S.

Fonte: Autoria Própria.

Na Figura 20, as regiões indicadas pelas setas, mostram que houve a ligação do anticorpo na região controle. Entretanto quando se compara os tratamentos de bloqueio, observa-se que nas tiras bloqueadas com BSA [DVS (+) BSA (+)], houve maior liberação do conjugado, no entanto, a BSA interagiu covalentemente com o papel, semelhante ao anticorpo, fazendo com que o corante Ponceau S tivesse seu sinal suprimido nas regiões de captura da tira em relação ao restante da mesma, já que a BSA é usada em maior concentração. Já as tiras não bloqueadas [DVS (+) BSA (-)], mostraram coloração intensa somente nos sítios de deposição do anticorpo e do conjugado. Além disso, observou-se que, as tiras não bloqueadas apresentaram uma liberação ainda menor do conjugado, talvez devido à forte interação da DVS disponível e as moléculas de anticorpo presentes na superfície das AuNPs (conjugado).

Uma das possibilidades, para a baixa liberação do conjugado é o fato da interação do conjugado com as fibras do papel devido aos sítios transformados pela DVS disponíveis, interferindo suficientemente no carregamento do tampão contendo o conjugado para a região controle. Sendo assim, o protocolo foi modificado pela diminuição da área tratada com DVS, tratando apenas as regiões de captura, seguida

de secagem por 1 h e posterior lavagem com água deionizada. Adicionou-se então os anticorpos anti-VERO produzidos em camundongo na região controle e proteínas extraídas de células VERO na região teste e secou-se as tiras por 1 h em estufa à 37 – 40 °C. Antes da etapa de bloqueio, às regiões de captura das tiras adicionou-se 2 µL de boroidreto de sódio 20% em hidróxido de amônio. O boroidreto é um redutor forte, que pode reverter a ligação da DVS no papel. Após a secagem do boroidreto, as tiras foram lavadas com água deionizada e bloqueadas com PBS 0,01 mol L⁻¹, pH 7,4 e BSA 1% e secas novamente. Sobre a região teste adicionou-se anticorpo anti-VERO produzido em camundongo (*RheaBiotech*) e aguardou-se secagem. O conjugado contendo anticorpo anti-IgG de camundongo produzido em coelho foi adicionado às tiras e os testes foram corridos em fluxo vertical com tampão PBS (Figura 21).

Figura 21. Tiras de papel Whatman nº 1 somente com as regiões de captura tratadas com DVS 10% em tampão carbonato e pH 11. Excesso de DVS removido com NaBH₃. As tiras foram bloqueadas com BSA. Imobilizou-se na região controle anticorpo anti-VERO produzido em camundongo e na região teste o extrato de proteínas de célula VERO. No conjugado, anti-IgG de camundongo produzido em coelho. Corrida com fluxo vertical de tampão PBS. Tiras coradas com Ponceau S.

Fonte: Autoria Própria.

Ao avaliar as imagens da Figura 21, pode-se observar que houve ligação dos anticorpos na fibra da celulose. No entanto, o sinal foi fraco, quando comparado com um teste de plataforma tradicional (dados não mostrados). Isso nos mostra a dificuldade em tratar uma região específica no papel de filtro devido à fatores como maior espalhamento do líquido filtro, menor capacidade de interação com o anticorpo, concentração alta de fibras acrescido, a inadequada qualidade dos pares antígeno e anticorpo utilizados nesse ensaio. Na Figura 22, comparou-se as tiras tratadas com DVS, que foram e não submetidas à etapa de remoção do excesso da DVS com o boroidreto, frente as que passaram pela etapa de remoção desse excesso. Claramente, o corante se comporta de maneira diferente, devido à ligação covalente nas regiões depositadas e também após o bloqueio com a BSA, levando à região de captura a ficar mais clara que o restante da tira (Figura 22 A). No caso da Figura 22 B, a remoção do excesso de DVS por boroidreto de sódio 20% mostrou-se efetiva, já que foram observadas nitidamente as imobilizações ocorridas nas linhas teste e controle.

Figura 22. Tiras de Whatman nº 1 tratadas com DVS. **A.** Não houve remoção do excesso de DVS pela ação do boroidreto de sódio. Imobilização apenas na região controle constituída de IgG anti-VERO produzido em camundongo. **B.** Remoção do excesso de DVS pela ação do boroidreto de sódio 20% em hidróxido de amônio, com as duas regiões de captura imobilizadas constituídas de IgG anti-VERO (região controle) e pool de proteínas extraído de célula VERO (região teste). Em ambas situações houve bloqueio com solução de BSA 1% em PBS 0,01 mol L⁻¹ pH 7,4.

Fonte: Autoria Própria.

3.5.2.3 Tratamento do papel de filtro Whatman nº 1 com Tampão Carbonato 0,1 e 0,2 mol L⁻¹ em pH 11

O tratamento com DVS é bastante funcional, no entanto muito laborioso visando um processo industrial. Com intuito de avaliar se a imobilização, ocorrida no papel, foi devido somente ao tratamento com a DVS, um controle negativo foi realizado em que o tratamento das tiras foi feito apenas com tampão carbonato em pH 11. Além de ser mais simples e facilitar o processo, este tampão apresenta um custo mais baixo comparado aos outros tratamentos avaliados. Para avaliar tal procedimento foram comparados ensaios com tampão carbonato nas concentrações de 0,1 e 0,2 mol L⁻¹ pH 11.

O tampão carbonato apresentava a concentração de 0,1 mol L⁻¹ de carbonato em pH 11. Foi feito um controle negativo do método da DVS, em que as tiras foram imersas por 2 h, somente em tampão carbonato. As tiras foram secas e nelas imobilizou-se IgG anti-VERO produzido em camundongo nas regiões controle. Após bloqueio e secagem, foram adicionados os conjugados e o teste foi corrido logo em seguida (Figura 23).

Figura 23. Tiras de Whatman nº 1 tratadas com tampão carbonato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em pH 11. Imobilização da região controle: IgG anti-VERO produzido em camundongo. No conjugado: AuNPs 10 nm e anti-IgG de camundongo produzido em coelho. **A.** Tiras bloqueadas com BSA 1%. **B.** Tiras lavadas com PBST sem BSA. As setas indicam o local das regiões controle das tiras.

Fonte: Autoria Própria.

Analisando a Figura 23, foi possível notar a presença de conjugado em toda a extensão da tira. Esse acúmulo em sítios inespecíficos é resultado da ineficiência do tratamento do bloqueio utilizado, o qual tem ainda outras funções como aumentar a liberação do conjugado e melhorar o sinal da região de captura. Visando otimizar esse tratamento, um ensaio foi realizado variando o tipo de aplicação (borrifamento ou imersão) e o tempo de imersão (5 a 15 min) das tiras, já sensibilizadas com os anticorpos anti-VERO (região controle), na solução de bloqueio (PBS $0,01 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,4 e BSA 1%) (Figura 24).

Figura 24. Variação dos tempos de bloqueio das tiras de papel Whatman nº 1 tratado com tampão carbonato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em pH 11. **A.** Tiras com solução de bloqueio borrifadas sobre a superfície. **B.** Tiras imersas por 5 min na solução de bloqueio. **C.** Tiras imersas por 10 min na solução de bloqueio. **D.** Tiras imersas por 15 min na solução de bloqueio. Na Linha controle: IgG anti-VERO. No conjugado: AuNPs 10 nm e Anti-IgG de camundongo produzido em coelho. Brilho da imagem alterado para +20%.

Fonte: Autoria Própria.

Avaliando os tempos de imersão das tiras na solução de bloqueio contendo BSA, conclui-se que não houve variação do resultado a partir de 5 min de imersão. Entretanto, o tipo de aplicação influenciou na distribuição da solução contendo a BSA durante o bloqueio. Neste caso, borrifar a solução mostrou uma distribuição não uniforme, com a presença de sítios não bloqueados levando assim, a uma menor liberação do conjugado em relação às tiras submetidas a imersão.

É possível notar, que o sinal da região de captura, ainda foi fraco. Dessa forma, aumentou-se a concentração do tampão carbonato para $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ em pH 11, mantendo-se o mesmo tempo de imersão das tiras para desprotonação da celulose do papel (Figura 25).

Figura 25. Tiras tratadas com tampão carbonato em pH 11, com região controle imobilizada. Sem conjugado, coradas com Ponceau S antes da etapa de bloqueio. **A.** Tratamento com tampão carbonato 0,1 mol L⁻¹ e imobilização de 3 µg de IgG anti-VERO produzido em camundongo. **B.** Tratamento com tampão carbonato 0,1 mol L⁻¹ e imobilização de 6 µg de IgG anti-VERO produzido em camundongo. **C.** Tratamento com tampão carbonato 0,2 mol L⁻¹ e imobilização de 3 µg de IgG anti-VERO produzido em camundongo. **D.** Tratamento com tampão carbonato 0,2 mol L⁻¹ e imobilização de 6 µg de IgG anti-VERO produzido em camundongo. Brilho da imagem alterado para +20%.

Fonte: Autoria Própria.

Na Figura 25, foi possível notar, via reação com Ponceau S, que o tampão carbonato 0,2 mol L⁻¹ não influenciou na interação do anticorpo com o papel, visto que não houve intensificação do sinal, quando se compara as imagens A e C ou B e D. Porém, a quantidade de anticorpo imobilizado no papel Whatman nº 1, mostrou uma correlação positiva com a intensidade do sinal, onde observou-se que as tiras com quantidades de anticorpos maiores (6 µg) apresentaram uma melhora no sinal em relação às tiras com 3 µg de anticorpo.

A partir dos resultados anteriores, um novo ensaio foi então realizado, aplicando-se o conjugado de AuNPs 10 nm com anti-IgG de camundongo produzido em coelho. Estes foram secos por 30 min em dessecador e as tiras corridas em fluxo vertical com tampão PBS 0,01 mol L⁻¹ pH 7,4. Os resultados obtidos se encontram na Figura 26.

Figura 26. Tiras tratadas com tampão carbonato em pH 11, com 6 μg de IgG anti-VERO produzido em camundongo imobilizado na região controle. Com conjugado de AuNPs e anti-IgG de camundongo produzido em coelho. **A.** Tratamento com tampão carbonato 0,1 mol L^{-1} . **B.** Tratamento com tampão carbonato 0,2 mol L^{-1} . As tiras foram corridas em fluxo vertical com tampão PBS 0,01 mol L^{-1} pH 7,4.

Fonte: Autoria Própria.

Com o resultado encontrado na Figura 26, confirma-se o resultado anterior, também encontrado na Figura 25, em que a concentração do tampão carbonato não altera significativamente o resultado, não levando à um aumento de material imobilizado na fibra. Porém, tanto o tampão carbonato quanto a DVS impedem a migração do conjugado, isso impede a intensificação do sinal, já que a maior parte do conjugado ficou retido. Para diminuir a retenção do conjugado, recortou-se a região do *conjugate pad* e não a submeteu ao tratamento com o tampão carbonato, para dessa forma, minimizar a interação do conjugado com a fibra do papel (Figura 27).

Figura 27. Tiras tratadas com tampão carbonato $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ em pH 11, com regiões teste e controle imobilizadas. Na região controle: IgG anti-VERO produzido em camundongo. Na região teste: extrato proteico de células VERO. No conjugado, AuNPs 10 nm e anti-IgG de camundongo produzido em coelho. Região do *conjugate pad* sem tratamento com o carbonato. As tiras foram corridas em fluxo vertical com tampão PBS $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,4. No controle positivo, adicionou-se IgG contra as proteínas de célula VERO sobre a região teste. Brilho da imagem alterado para +20%.

Fonte: Autoria Própria.

Novamente, uma baixa intensidade de sinal foi visualizada sobre as regiões de captura. É sabido que a imobilização das regiões na fibra do papel tem ocorrido em diferentes concentrações de tampão carbonato. No entanto, a sensibilidade e especificidade do complexo antígeno-anticorpo não se mostrou adequada para um teste imunocromatográfico, onde essas características não se apresentaram satisfatórias para um bom teste. Com o intuito de confirmar tal fato, o mesmo procedimento foi repetido com outro complexo de antígeno-anticorpo disponíveis na Empresa *ParteCurae*. Nesse caso, anticorpo policlonal anti-proteína A produzido em coelho (*Sigma Aldrich*) e o antígeno, proteína A (*Sigma Aldrich*), foram imobilizados no papel de filtro Whatman nº 1 e submetidos ao mesmo tratamento descrito anteriormente

(Figura 28). Como esperado, observa-se uma liberação maior de conjugado da região *conjugate pad*, para o teste com o complexo anti-proteína A-proteína A, sem o tratamento com tampão carbonato.

Figura 28. Tiras tratadas com tampão carbonato $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ em pH 11, com regiões teste e controle imobilizadas. Na região controle: Anti-IgG de coelho produzido em cabra. Na região teste: IgG anti-proteína A produzido em coelho. No conjugado AuNPs 10 nm e IgG anti-proteína A produzido em coelho. Região do *conjugate pad* sem tratamento com o carbonato. Nos positivos adicionou-se proteína A no tampão PBS $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,4 e as tiras foram corridas em fluxo vertical. No controle negativo, correu-se as tiras em fluxo vertical apenas em tampão PBS.

Fonte: Autoria Própria.

Foi visualizado também, na Figura 28, uma maior intensidade do sinal nas linhas teste e controle, comprovando que o tratamento de imobilização se mostrou eficiente e que o complexo utilizado possui boa especificidade e qualidade, uma vez que esses parâmetros influenciam diretamente na sensibilidade do teste. Dessa forma, o tratamento empregado foi considerado satisfatório e representa uma diminuição ainda maior do custo, já que se emprega menos reagentes no tratamento da matriz do papel celulósico.

Capítulo 4: Conclusões e Perspectivas Futuras

Com todos os experimentos realizados até aqui, pode-se concluir que a teoria empregada no desenvolvimento de uma plataforma de teste imunocromatográfico é relativamente simples, no entanto, é necessário muito estudo e experimentos para que se encontre a melhor condição e com máximo desempenho.

As etapas de padronização são de suma importância, principalmente para a validação do funcionamento e qualidade dos insumos empregados na fabricação dessas plataformas. Materiais de baixa qualidade, além de apresentarem reações cruzadas (no caso de falta de especificidade dos anticorpos), não mostram o real resultado quando submetidos a diferentes protocolos, tornando a etapa de padronização mais laboriosa.

Neste trabalho, a análise por *immunoblotting* permitiu identificar e evitar problemas futuros com o uso dos anticorpos produzidos inicialmente contra a cinomose. Ainda assim, esses anticorpos inespecíficos puderam ser utilizados em algumas etapas da padronização da plataforma. No entanto, quando a avaliação de sinal se fez necessária, o complexo antígeno-anticorpo necessitou ser alterado, mostrando a efetividade da plataforma desenvolvida, independente da doença a ser diagnosticada.

Tanto o tratamento com tampão carbonato quanto com DVS, mostraram-se eficientes para a imobilização dos reagentes na região de captura, comparados ao periodato de sódio. Porém, a substituição da DVS foi bastante conveniente, devido a facilidade no processo de escalonamento da produção das plataformas, visto que além de representar um aumento de custo, a DVS é tóxica e o seu excesso deve ser retirado no final do processo com o boroidreto de sódio. O manuseio da DVS também exige cuidados, ao contrário do tampão carbonato, que não apresenta toxicidade ou riscos à saúde.

Tanto o papel com tampão carbonato como o tratado com a DVS apresentaram interação com o conjugado, no entanto o problema foi facilmente resolvido, separando a *conjugate pad*, região sem tratamento. Na produção em escala esse procedimento deverá ser adaptado, para que a tira seja única, visto que esse papel não permite colagem das estruturas sobre um cartão adesivo, caso contrário, o fluxo não será por capilaridade e sim por condução do líquido pela superfície criada, que resulta em um fluxo mais rápido e consequentemente diminuição do sinal das regiões de captura.

Quando o papel de filtro Whatman nº 1 foi substituído na região do *conjugate pad*, este apresentou uma performance satisfatória, no entanto, foi observado uma retenção de conjugado, o que é altamente indesejável, já que consiste em um aumento de gastos em uma das regiões mais onerosas do teste (Anexo), bem como à diminuição da eficiência de sinal nas regiões de captura. Dessa forma, o papel deverá receber algum tipo de tratamento prévio, para diminuir ainda mais essa retenção ocasionada.

O protocolo de conjugação por adsorção física mostrou-se eficiente, além de ser muito simples de executar, porém, são conhecidas metodologias de conjugação covalente que podem ser avaliados aplicando-se nessa mesma plataforma de Whatman nº 1. No geral, os protocolos de conjugação covalente utilizam uma quantidade muito menor de anticorpos, sem implicar em perda de eficiência ou sinal, o que leva a uma diminuição impactante tanto no custo (visualizar anexo) de produção quanto na diminuição do uso de cobaias, já que os conjugados são feitos pela interação de partículas metálicas com anticorpos policlonais, oriundos de animais.

Para a confecção dos conjugados, utilizou-se AuNPs de 10 nm comerciais que poderão ser substituídas pelas AuNPs sintetizadas em laboratório. A síntese deve ser feita cuidadosamente, bem como a padronização e caracterização do produto obtido. Cabe salientar que o uso de AuNPs próprias será de grande impacto no custo final de acordo com o descrito no anexo. Além disso, será possível avaliar os diferentes tamanhos das partículas, e comparar com a melhora na intensidade de sinal do teste.

Finalmente, em relação ao teste de cinomose em papel de filtro, objetivo dessa proposta, assim que as proteínas recombinantes forem entregues, novos ensaios serão realizados, tanto de *immunoblotting* para verificação da especificidade e sensibilidade dos novos complexos (antígeno-anticorpos) adquiridos, quanto ensaios de plataforma, no que se refere à imobilização e posteriormente a avaliação dessas plataformas frente às amostras reais pré-validadas.

Referências Bibliográficas

- 1 KOUTINAS, A.F.; POLIZOPOULOU, Z.S.; BAUMGAERTNER, W.; LEKKAS, S. & KONTOS. **Relation of clinical signs to pathological changes in 19 cases of canine distemper encephalomyelitis.** J. Comp. Pathol 2002 v. 126 p. 47-56.
- 2 MONTI, F.S. Tese: **Anticorpos Contra o Vírus da Cinomose em Cães Vacinados em Diferentes Estabelecimentos da Área Urbana do Município de Viçosa/MG.** Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, MG, Brasil, 2004.
- 3 POZZA, M. Dissertação: **Deteção e Análise Molecular do Virus da Cinomose Canina.** Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Agronomia. Porto Alegre, RS, Brasil, 2005.
- 4 MANGIA S.H.; PAES A.C. **Neuropatologia da Cinomose** Vet. e Zootec, v. 15, n. 3, p. 416-427, 2008.
- 5 PUERTO, H. L. D.; VASCONCELOS, A. C.; MORO, L.; ALVES, F.; BRAZ, G. F.; MARTINS, A. S. **CANINE distemper virus detection in asymptomatic and non vaccinated dogs.** Pesq. Vet. Bras 2010. V. 30 p.139-144.
- 6 DEEM, S. L.; SPELMAN, L. H.; YATES, R. A.; MONTALI, R. J. **Canine distemper in terrestrial carnivores: a review.** *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 2000 v.31 p. 441–451.
- 7 CORRÊA C.N.M. Cinomose. In: CORRÊA WM; CORRÊA CNM. (Eds). **Enfermidades Infecciosas dos Mamíferos Domésticos.** Rio de Janeiro: Medsi, p. 655-670, 1992.
- 8 ETTINGER S.J.; FELDMAN E.C. **Tratado de medicina interna veterinária.** 1 ed. Manole: São Paulo, p. 315-319, 1997.
- 9 SONNE, L.; OLIVEIRA, E.C.; PESCADOR, C.A.; SANTOS, A.S.; PAVARINI, S.P.; CARISSIMI, A.S.; DRIEMEIER, D. **Achados patológicos e imuno-histoquímicos em cães infectados naturalmente pelo vírus da cinomose canina.** Pesq. Vet. Bras. v. 29 n.2, p.143-149, 2009.
- 10 HEADLEY, S. A.; AMUDE A. M.; ALFIERI, A. F.; BRACARENSE, A. P. F. R. L.; ALFIERI, A. A. **Epidemiological features and the neuropathological manifestations of canine distemper virus-induced infections in Brazil: a review.** Semina: Ciências Agrárias, Londrina, v. 33, p. 1945-1978, 2012.
- 11 OTSUKI, N.; NAKATSU,Y.; KUBOTA, T.; SEKIZUKA, T.; SEKI, F.; SAKAI, K.; KURODA, M.; YAMAGUCHI, R.; TAKEDA, M. **The V Protein of Canine Distemper Virus Is Required for Virus Replication in Human Epithelial Cells.** Plos One. v. 8. 8 p. 2013.

- 12 APPEL, M.J.G.; SUMMERS, B.A. **Recent Advances in Canine Distemper Diseases**, 1999. Disponível em: www.ivis.org. Acesso em 03/04/2013.
- 13 MORITIZ, A.; FRISK, A.L; BAUMGARTNER, W. **The evaluation of diagnostic procedures for the detection of canine distemper virus infection**. European Journal Company Animal Practice, v. 10, p. 37-45, 2000.
- 14 CURTI, M.C.; ARIAS, M.V.B.; ZANUTTO, M.S. **Avaliação de um Kit de Imunoensaio cromatográfico para a Detecção do Antígeno do Vírus da Cinomose em Cães com Sinais Sistêmicos ou Neurológicos da Doença**. Semina: Ciências Agrárias, Londrina, v. 33, n. 6, p. 2383-2390, nov./dez. 2012.
- 15 WONG, C. R.; TSE, H. Y. **Lateral Flow Immunoassay**. Springer 2009.
- 16 DUARTE, S.C.; PARENTE, J.A.; LINHARES, G.F.C. **Diagnóstico Molecular de *Ehrlichia canis* Em Cães de Goiânia**. Revista de Patologia Tropical, v. 42, n. 1, p. 30-41, 2013.
- 17 HERMANSON G.T. Bioconjugate Techniques. In: Polymeric Microspheres and Nanospheres. Rockford: Eselvier, 2008.p. 582-626.
- 18 JAZAYERI,M.H.; AMANI, H.; POURFATOLLAH, A.A.; PAZOKI-TOROUDI, H.; SEDIGHIMOGHADDAM, B. **Various methods of gold nanoparticles (GNPs) conjugation to antibodies, Sensing and Bio-Sensing Research** v. 9 p. 17–22, 2016.
- 19 MAGI. B, LIBERATORI. S. **Immunoblotting techniques**. Methods Mol Biol. v. 295.p. 22 7-254. 2005.
- 20 OLIVEIRA, F. C. **Produção, Caracterização, Purificação Parcial e Aplicação de um Peptídeo Antimicrobiano Produzido por *Bacillus licheniformis* P40**. 2004. 134 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Meio Ambiente)- Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2004.
- 21 LAEMMLI, U.K. **Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4**. Nature, v. 227, p. 680-685, 1970.
- 22 STUDIER, F.W. **Analysis of Bacteriophage T7 early RNAs and Proteins on slab gels**. J. Mol. Biol., v. 79, p. 237-48, 1973.
- 23 TOWBIN, H.; STAEBELIN, T.; GORDON, G. **Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications**. Proc. Nat. Acad Sci USA, v. 76, 4350-4354, 1979.
- 24 ZELLNER, M.; WINKLER, W.; HAYDEN, H.; DIESTINGER, M.; ELIASSEN, M.; GESSLBAUER, B.; MILLER, I.; CHANG, M.; KUNGL, A.; ROTH, E.; OEHLER, R.; **Quantitative validation of different protein precipitation methods in proteome analysis of blood platelet**. Electrophoresis, v. 26, p. 2481-2489, 2005.

25 WEBVET. Artigos Técnicos. **Um novo olhar sobre a Cinomose Canina e os benefícios das vacinas recombinantes.** Disponível em: <http://www.webvet.com.br/artigos-tecnicos/Artigos/um-novo-olhar-sobre-cinomose-canina.pdf>. Acessado em: 08/12/16.

26 Disponível em: UNIPROT - <http://www.uniprot.org>. Acessado em: 08/12/16.

27 Disponível em: <https://www.virbac.com.br/caes/canigen-v8>. Acessado em: 20/10/2016.

28 Disponível em: www.merckmillipore.com/office. Rapid Lateral Flow Test Strips – Consideration for product development. Merck Millipore, Diss, 2013, 33p. Acessado em: 11/12/16.

29 WANG, S.; GE, L.; SONG, X.; YAN, M.; GE, S.; YU, J.; ZENG, F. **Simple and covalent fabrication of a paper device and its application in sensitive chemiluminescence immunoassay.** Analyst. v. 137. p. 3821–3827. 2012.

30 YU, A.; SHANG, J.; CHENG, F.; PAIK, B. A.; KAPLAN, J. M.; ANDRADE, R. B.; RATNER, D. M. **Biofunctional Paper via Covalent Modification of Cellulose.** Langmuir. v. 28. p. 11265–11273. 2012.

31 MIKAWA, Angela Yumico. **DESENVOLVIMENTO DE TESTE IMUNOCROMATOGRÁFICO PARA DETECÇÃO DE ANTÍGENO CIRCULANTE DO VÍRUS DA HEPATITE C.** 2006. 171 f. Tese (Doutorado em Imunologia Clínica)- Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2006.

32 KOLOSOVA A. Y.; SIBANDA, L.; DUMOULIN, F.; LEWIS, J.; DUVEILLER, E.; PETEGHEM, C. V.; SAEGER, S. **Lateral-flow colloidal gold-based immunoassay for the rapid detection of deoxynivalenol with two indicator ranges.** Analytica Chimica Acta, v. 616. p. 235–244. 2008.

33 TEIWES, H. **A Paper-Based Lateral Flow Device For The Detection Of IxIP Via Elisa.** 2014. 134 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia mecânica e mecânica aplicada). University Of Rhode Island. Kingston, Rhode Island. 2014.

34 BHANDARI, P.; NARAHARI, T.; DENDUKURI, D. **‘Fab-Chips’: a versatile, fabric-based platform for low-cost, rapid and multiplexed diagnostics.** Lab on a Chip. v.11. p. 2493–2499. 2011.

35 CHOI, D. H.; LEE, S. K.; OH, Y. K.; BAE, B. W.; LEE, S. D.; KIM, S.; SHIN, Y. B.; KIM, M.G. **A dual gold nanoparticle conjugate-based lateral flow assay (LFA) method for the analysis of troponin I.** Biosensors and Bioelectronics. v. 25. p. 1999–2002. 2010.

- 36** ZHANG, Y.; BAI, J.; YING, J. Y. **A stacking flow immunoassay for the detection of dengue-specific immunoglobulins in salivary fluid.** *Lab on a Chip*. v. 15. p. 1465-1471. 2015.
- 37** WALTHER, M.; FRIBE, A. **A guide to diagnostic rapid test development.** 1^a ed. GE Healthcare; 18 p. 2008.
- 38** Disponível em: <http://www.sigmaaldrich.com/materials-science/nanomaterials/gold-nanoparticles.html> (Acessado em 24/11/16).
- 39** Disponível em: <http://photobiology.info/Berg.html> (Acessado em 24/11/16)
- 40** MUROV, S. L.; . G. L. ***Handbook of Photochemistry, Second Edition.*** Marcel Dekker. New York. Basel. 432 p. 1993.
- 41** TAM, M.E.A.; SCHIFFERLI, K.H. **Structure and function of nanoparticle–protein conjugates.** *Biomedical Materials*. v.3. 17 p. 2008.

Anexo

Tabela 1. Custo da plataforma convencional frente às membranas e papéis, desconsiderando os demais reagentes.

Região do teste e dimensões em centímetros	Material utilizado	Preço por cm ²	Preço por tira
Membrana de nitrocelulose (2,5 x 0,5)	Immunopore FP	R\$ 0,97	R\$ 1,21
Conjugate pad (1,0x 0,5)	Standard 14	R\$ 0,49	R\$ 0,42
Sample pad (1,7 x 0,5)	Standard 17	R\$ 0,49	R\$ 0,24
Absorbent pad (1,7 x 0,5)	CF5	R\$ 0,49	R\$ 0,42
Custo total			RS 2,29

Fonte: <http://www.gelifesciences.com/webapp/wcs/stores/servlet/Home/en/GELifeSciences-br/> (acessado em 03/03/17)

Tabela 2. Custo da plataforma em papel de filtro Whatman nº1 desconsiderando os demais reagentes.

Dimensões da tira em centímetros	Material utilizado	Preço por cm ² *	Preço por tira
7,5 x 0,5	Papel de Filtro Whatman nº1	R\$ 0,00313	R\$ 0,012
Custo total			R\$ 0,012

Fonte: <http://www.sigmaaldrich.com/labware/labware-products.html?TablePage=17214221> (acessado em 03/03/17)

*O preço por cm² foi obtido através das médias dos valores cobrados pelos pacotes de folhas de papel de filtro Whatman nº 1 com dimensões variando de 600 x 600; 580 x 680; 460 x 570 (mm x mm)

Diminuição de custos: $\frac{(2,29-0,012).100\%}{2,29} = 99,48\%$

Tabela 3. Custo da plataforma em relação aos demais reagentes utilizados.

Material utilizado	Região de aplicação	Quantidade utilizada por tira	Preço por tira
AuNP 10 nm	Conjugate pad	100 µL	R\$ 2,137
IgG Anti-cão	Conjugado	20 µg	R\$ 2,39
Proteína recombinante*	Linha teste	3 µg	R\$ 4,80
Anticorpo policlonal de cão	Linha controle	3 µg	R\$ 0,0057
BSA	Bloqueio da tira	0,01 g	R\$ 0,3334
BSA	Bloqueio de conjugado	0,0002 g	R\$ 0,007
Sacarose	Bloqueio de conjugado	0,05 g	R\$ 0,0015
Total			R\$ 9,675

Fonte: http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/a9418?lang=pt®ion=BR&gclid=Cj0KEQIAI4TGBRDhgvnikdHPsdABEiQAtBcc8OifWj6TGzB2FWUSoWUVNEK_3P0Juf7Dzy6y1FuGy88aAkR68P8HAQ (Acessado em: 09/03/17)

<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/d7407?lang=pt®ion=BR> (Acessado em: 09/03/17)

<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/741957?lang=pt®ion=BR> (Acessado em: 09/03/17)

<https://www.innov-research.com/product/canine-igg/> (Acessado em: 09/03/17)

<http://www.lojasynth.com/reagentes-analiticasmaterias-primas/reagentes-analiticasmaterias-primas/sacarose-p-a-a-c-s> (Acessado em: 09/03/17)

*Cotação fornecida pela empresa Cellco, fabricante das proteínas recombinantes adquiridas pela ParteCurae.

Custos da plataforma convencional: R\$ 9,675 + R\$ 2,29 = R\$ 11,965

Custos da plataforma proposta: R\$ 9,9675 + R\$ 0,012 = R\$ 9,987

Diminuição de custos: $\frac{(11,965 - 9,987) \cdot 100\%}{11,965} = 16,53\%$.

Ao produzir as nanopartículas de ouro haverá uma diminuição ainda maior no custo da plataforma e a economia gerada pela substituição do tipo de papel será ainda mais representativa no custo final do produto.

Tabela 4. Comparação entre os custos das nanopartículas comerciais e produzidas em laboratório.

Reagentes	Volume	Preço
Partículas Fabricadas*	100 mL	R\$ 19,561
Partículas Comerciais	100 mL	R\$ 2,137.00

Fonte: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/254169?lang=pt®ion=BR&gclid=Cj0KEQiAl4TGBRDhgvmikdHPsdABEiQAtBcc8CPALfoZycWbODSpctmBU5gT5O-6ZfE2tLrfNEoxL8aAs2Q8P8HAQ> (Acessado em 09/03/17)

<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/s4641?lang=pt®ion=BR> (Acessado em 09/03/17)

*Considerando quantidades usuais de ácido cloroáurico e citrato de sódio descritos em protocolos na literatura para obtenção de partículas de 10 nm de diâmetro aproximadamente.

Diminuição de custos considerando nanopartículas fabricadas em laboratório e papel Whatman nº 1 na plataforma:

$$\frac{(9,847 - 7,569) \cdot 100\%}{9,847} = 23,13\%.$$