

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM VIGILÂNCIA SANITÁRIA
INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

Edinéa Pastro Mendes

**DESENVOLVIMENTO DE CONTROLES DE PROCESSO PARA A PRODUÇÃO DE
CONJUGADO DE ANTICORPO ANTI-IgG CANINA COM PEROXIDASE DE RAIZ
FORTE UTILIZADO NO KIT PARA DETECÇÃO DE LEISHMANIOSE CANINA**

Rio de Janeiro

2013

Edinéa Pastro Mendes

**DESENVOLVIMENTO DE CONTROLES DE PROCESSO PARA A PRODUÇÃO DE
CONJUGADO DE ANTICORPO ANTI-IgG CANINA COM PEROXIDASE DE RAIZ
FORTE UTILIZADO NO KIT PARA DETECÇÃO DE LEISHMANIOSE CANINA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Vigilância Sanitária do Instituto Nacional do Controle de
Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz como
requisito parcial para obtenção do título de Mestre em
Vigilância Sanitária.

Orientadores: Dra. Ana Paula Dinis Ano Bom
Dra. Maria Helena Simões Villas Bôas

Rio de Janeiro

2013

Catálogo na fonte

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Biblioteca

Mendes, Edinéa Pastro

Desenvolvimento de controles de processo para a produção de conjugado de anticorpo anti-IgG canina com peroxidase de raiz forte utilizado no kit para detecção de leishmaniose canina. / Edinéa Pastro Mendes. - Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2013.

107f. : il.

Trabalho de conclusão de curso (Mestrado em Vigilância Sanitária) – Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz. 2013.

Orientadoras: Ana Paula Dinis Ano Bom e Maria Helena Simões Villas Bôas

1. Leishmaniose Canina. 2. Imunoglobulina G. 3. Kit de Reagentes para Diagnóstico. I. Título

Development of process control strategies for the production of canine anti-IgG/horseradish peroxidase (HRP) conjugate included in diagnostic test for canine leishmaniasis.

Edinéa Pastro Mendes

DESENVOLVIMENTO DE CONTROLES DE PROCESSO PARA A PRODUÇÃO DE
CONJUGADO DE ANTICORPO ANTI-IgG CANINA COM PEROXIDASE DE RAIZ
FORTE UTILIZADO NO KIT PARA DETECÇÃO DE LEISHMANIOSE CANINA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional do Controle
de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz como
requisito parcial para obtenção do título de Mestre em
Vigilância Sanitária.

Aprovado em: 28/05/2013

BANCA EXAMINADORA

Isabella Fernandes Delgado (Doutor)
Instituto Nacional do Controle de Qualidade em Saúde

Theo Luiz Ferraz de Souza (Doutor)
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Hilton Jorge Nascimento (Doutor)
Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos

Ana Paula Dinis Ano Bom (Doutor) - Orientador
Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos

Maria Helena Simões Villas Bôas (Doutor) - Orientador
Instituto Nacional do Controle de Qualidade em Saúde

Rio de Janeiro
2013

Dedico este trabalho aos meus pais Pedro e Eliza,
ao meu marido Paulo Roberto Pimenta e aos meus filhos,
Paula e Fellipe, razão da minha existência, meu bem maior,
por todo amor, carinho, dedicação, compreensão, apoio e incentivo.

AGRADECIMENTOS

A Deus por me dar forças mesmo quando eu achava que não ia conseguir.

À Dra. Ana Paula Dinis Ano Bom, minha orientadora, pela sua receptividade, dedicação, justiça, competência, carinho e ensinamentos. Por acreditar na minha capacidade e por ter “segurado a minha mão e me ajudado a caminhar” nos momentos mais impactantes. Pelo aprendizado pessoal, pois ser sua orientanda foi uma honra e dádiva divina.

À Dra. Maria Helena Villas Boas, minha orientadora do INCQS, pela orientação nesta dissertação e correção. Pelos conselhos, pelo carinho, pelo incentivo e por aceitar ser minha orientadora.

Aos professores que aceitaram participar da banca examinadora desta dissertação: Isabella Fernandes Delgado, Theo Luiz Ferraz de Souza, Hilton Jorge Nascimento, Verônica Viana Vieira e Carla Ribeiro Polycarpo.

Aos chefes do LAMAM Prof. Dr. José Godinho da Silva Jr. e Dr. Hilton Jorge Nascimento por terem me recebido e permitido os trabalhos experimentais em seu laboratório e também por contribuírem para a minha formação e meu crescimento profissional.

Aos meus chefes Antônio Barbosa, Raouf Emily Sykora e Marco Antônio Lemos, pela permissão para o mestrado, pelo apoio e compreensão. Obrigada por acreditarem em mim e espero poder retribuir essa confiança com trabalho e dedicação.

À equipe da SEICA; Lucielen Barros de Freitas, Elaine do Carmo Paschoa, Felipe Rodrigues Costa, Simone de Amorim Chermont, Rafael de Oliveira Resende e Ana Maria Caldas, pelo apoio e compreensão e por segurarem as “pontas” na seção na minha ausência.

Às equipes do SEPRO e SEBRE pelo apoio, em especial à Gisele e Renata pela ajuda com a leitura das placas de Elisa.

Aos queridos amigos do LAMAM; Renata Chagas Bastos, Patrícia Jurgilas e Ana Paula Araújo, pela ajuda imensa neste trabalho e que tiveram o exato sentimento de “coração de mãe”, pois muitas vezes disputei espaço, bancada e equipamentos. À Priscila Muniz da Paz e Izabella Butty em especial pela ajuda no fluorímetro, a analisar géis e melhorar os gráficos do cromatógrafo e pela ajuda com os gráficos do Sigma Plot.

Ao amigo e chefe do LATED, Edimilson Domingos da Silva por ter acompanhado, sugerido e incentivado a execução deste trabalho, por ter disponibilizado seu laboratório e sua equipe para me ajudar no que fosse preciso, pela doação das placas sensibilizadas e por ser exemplo de excelente profissional.

Aos colegas do LATED, especialmente às amigas Cláudia Moraes Molinaro, Eliane Couceiro Cunha e Maria Célia Chaves Zuma que prestaram valiosa colaboração no Laboratório e até pela companhia nos cafezinhos da tarde.

Ao amigo e chefe do LACORE Luiz Alberto Pereira, pela ajuda preciosa para o fechamento dos experimentos e conclusão da dissertação e à sua equipe, em especial ao Adenauer pela ajuda e seleção do painel e à Diana pelo apoio, companhia, carinho e amizade.

Aos meus amigos do DERED; Angélica, Cláudia Barroso, Ana Paula Bezerra, Danielle Custódio, Pedro Paulo, Rafael Alexandrino, Elisabete, Elaine, Paulo Aguiar, e Jorge pelo apoio, carinho e amizade.

À coordenação do Curso de Pós-graduação em Vigilância Sanitária do INCQS / FIOCRUZ.

A todos os amigos de Bio-Manguinhos pelo apoio, carinho, amizade, cooperação.

Aos amigos de turma do Curso de Especialização em Vigilância Sanitária do INCQS pelo carinho e amizade.

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização desta Dissertação.

RESUMO

Leishmaniose é uma doença endêmica presente em mais de 80 países no mundo incluindo o Brasil, tornando-se um grave problema de saúde pública no mundo. A leishmaniose visceral (LV) causada pelo parasito *Leishmania chagasi* é uma doença que ocorre em seres humanos sendo cães um dos reservatórios do parasito. Dessa forma, o diagnóstico canino é essencial para os programas de vigilância da LV. No Brasil, o controle da LV é realizado pelo Ministério da Saúde, no qual preconiza a eutanásia de cães soropositivos, o controle do vetor, o diagnóstico precoce e o tratamento de casos humanos. No entanto, o impacto dessas medidas não tem surtido o efeito esperado na redução de casos humanos. Neste sentido, o correto diagnóstico é um importante passo para evitar a eutanásia desnecessária de cães e a transmissão da doença, pois assim evita-se que o cão infectado permaneça no ambiente como fonte de infecção. Bio-Manguinhos possui uma ampla linha de reativos para diagnóstico, dentre eles o Ensaio Imunoenzimático (Elisa) para diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina (EIE-LVC), o qual apresenta a possibilidade de diagnóstico em larga escala, melhor leitura e interpretação dos resultados quando comparado a outros testes sorológicos. Para competir com os demais produtos que atuam no mercado são necessários novos estudos que possam melhorar a eficiência e qualidade do *kit* (EIE-LVC). Nesta dissertação algumas estratégias foram estabelecidas e técnicas foram otimizadas para a produção de conjugados de anticorpos anti-IgG canina marcados com peroxidase (IgG-HRP) produzidos na Seção de Insumos, Conjugados e Apoio (SEICA)/Bio-Manguinhos. Neste estudo a obtenção da IgG foi realizada pelas etapas de precipitação com sulfato de amônio, dessalinização em cromatografia de exclusão e peneiração molecular (SEC) e purificação por cromatografia de troca aniônica em coluna Poros HQ. A imunoglobulina purificada foi analisada por SDS-PAGE, IEF-PAGE e quantificada pelo método de BCA. A conjugação da IgG purificada à HRP foi realizada através da metodologia de aminação redutiva, utilizando diferentes concentrações de metaperiodato de sódio e borohidreto de Sódio. Após a obtenção dos conjugados, estes foram avaliados quanto à conformação através de SEC, dicróismo circular e espectrometria de fluorescência e caracterizados imunologicamente através de Elisa. A estabilidade dos conjugados foi avaliada através de curvas de desnaturação térmica e por testes de estabilidade acelerada. Os ensaios de monitoramento conformacional indicam que os conjugados apresentam uma grande estabilidade conformacional. Os ensaios de estabilidade acelerada ocorreram em três condições de temperatura a 4°C, 37°C e 50°C, utilizando o estabilizante comercial Guardian™ em substituição ao estabilizante clássico do *kit* e placas preparadas para estocagem a 4°C. A eficiência dos conjugados nestas condições foi avaliada por meio de Elisa frente a placas previamente sensibilizadas com antígeno de LV, contra soros positivos e negativos de painéis sorológicos padronizados utilizados no diagnóstico canino. Nossos dados de estabilidade acelerada indicam que os conjugados mantiveram a eficiência no reconhecimento dos anticorpos, mesmo em altas temperaturas, evidenciando que estes possuem estabilidade compatível para armazenamento a temperatura de 2°C a 8°C. Ao comparar os conjugados obtidos sob as novas condições com o conjugado clássico verificamos que ambos são capazes de distinguir as amostras positivas e negativas. Sendo assim, a implantação das novas estratégias demonstradas nesta dissertação podem ser utilizadas para aumentar a validade dos *kits* e facilitar o processo de produção.

Palavras-chave: Leishmaniose. Conjugado IgG-HRP. Ensaio imunoenzimático.

ABSTRACT

Leishmaniasis is an endemic disease in more than 80 countries in the world, including Brazil, and has now become a serious public health problem. Visceral leishmaniasis (VL) caused by the parasite *Leishmania chagasi* is a disease that occurs in humans with dogs being one of the hosts of the parasite. This way, the canine diagnosis is essential for the VL surveillance programs. In Brazil, the burden of control of the VL lies with the Health Ministry, and the recommendation is euthanasia for serum positive dogs, vector control, early diagnosis and VL human cases treatment. However, the impact of these actions has not produced the expected effect in the reduction of cases in humans. Then, the correct diagnosis is very important to avoid the unnecessary dog's euthanasia and disease transmission, because this prevents the infected dogs to remain in the domestic environment as a source of infection. Bio-Manguinhos has a wide diagnosis reagents line, including enzyme-linked immunosorbent assay (Elisa) for diagnosis of Canine Visceral Leishmaniasis (EIE-CVL), which shows the possibility of large-scale diagnosis, with superior analysis and interpretation of the results when compared to other serological tests. In order to compete with other diagnosis products, further studies are necessary, which can improve the efficiency and quality of the kit (EIE-CVL). In this dissertation some strategies have been established and techniques have been optimized for the production of canine anti-IgG antibody with peroxidase (IgG-HRP) conjugated produced by Seção de Insumos Conjugados e Apoio (SEICA)/Bio-Manguinhos. In this study the IgG was obtained by the ammonium sulfate precipitation steps, desalinization at molecular sieving and exclusion chromatography (SEC) and purification by anion exchange chromatography on Poros HQ column. The purified IgG was analyzed by SDS-PAGE, IEF-PAGE and quantified by BCA method. The conjugation of the purified IgG to HRP was performed by reductive amination methodology using different concentrations of NaBH_4 and NaIO_4 . After obtaining conjugates, they were evaluated by the conformation analysis using SEC, circular dichroism and fluorescence spectrometry techniques and immunological characterized by Elisa. The conjugates stability was assessed through denaturation thermal curves and accelerated stability tests. The conformational monitoring tests indicate that conjugates exhibit a large conformational stability. Accelerated stability testing occurred in three temperature conditions at 4°C , 37°C and 50°C , using commercial stabilizer Guardian™ replacing the kit stabilizer and plates prepared for storage at 4°C . The conjugates efficiency under these conditions was assessed by Elisa against plates previously sensitized with LV antigen against positive and negative sera derived from standard serum panel used in the canine diagnosis. Our accelerated stability data indicate that conjugates maintained the antibody recognition efficiency even at high temperatures, indicating that they have stability to storage at a temperature of 2 to 8°C . When comparing the conjugates obtained under the new conditions with the actual conjugate we find that both of them are able to distinguish between positive and negative samples. Therefore, the employment of new strategies demonstrated in this thesis can be used to increase the kit validity period and facilitate the production process.

Key-words: Leishmaniosis. IgG-HRP Conjugated. Immunosorbent Assay.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Formas <i>Leishmania</i> spp	20
Figura 2	Ciclo biológico e modo de transmissão da <i>Leishmania</i> spp	21
Figura 3	Estrutura da imunoglobulina G.....	29
Figura 4	Classes de Imunoglobulinas.....	30
Figura 5	Representação da planta de onde se extrai a peroxidase de raiz forte, <i>Azadirachta indica</i> (A). Representação tridimensional da estrutura da HRP por cristalografia de raio-X (B).	32
Figura 6	Reação de conjugação por aminação reductiva entre HRP e IgG	36
Figura 7	Desenho esquemático da absorção da luz circularmente polarizada por uma amostra	38
Figura 8	Representação esquemática do processo de conjugação	47
Figura 9	Dessalinização do soro hiperimune precipitado contendo anti-IgG canina por cromatografia de peneiração e exclusão molecular	53
Figura 10	Purificação da anti-IgG canina por cromatografia de troca iônica em coluna Poros HQ	54
Figura 11	Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio 7,5% na ausência de DTT	56
Figura 12	Eletroforese em gel de poliacrilamida 12% com dodecil sulfato de sódio na presença de DTT	58
Figura 13	Focalização isoelétrica em gel de poliacrilamida pH 3-9 para estimativa do pI da imunoglobulina purificada, analisada pelo programa <i>Image Master</i>	60
Figura 14	Curva Padrão de BSA, equação da reta e o coeficiente de concentração linear para quantificação da IgG em todas as etapas do processo purificativo	62
Figura 15	Curva de calibração do método de BCA feita a partir das soluções de BSA padrão	63
Figura 16	Análise dos conjugados pelo método de exclusão e peneiração molecular	66
Figura 17	Análise conformacional dos conjugados por fluorescência e dicroísmo circular	69
Figura 18	Efeito da temperatura sobre os conjugados	71

Figura 19	Análise de Elisa na diluição 1:20.000 dos conjugados 1, 2, 3 e 4	72
Figura 20	Representação gráfica do teste de Elisa para a escolha da melhor titulação dos três conjugados	74
Figura 21	Gráfico representativo das D.O. das amostras positivas (41 a 45), controle positivo, amostras negativas (81 a 85), controle negativo e amostra sem soro (branco) frente ao conjugado 1, 2, 3 submetido à temperatura de 4°C após o teste de Elisa inicial ponto “0”	77
Figura 22	Gráfico representativo dos testes de Elisa realizados com os conjugados armazenados a 4°C durante 45 dias	80
Figura 23	Gráfico representando as D.O. dos controles positivo e negativo e amostra sem soro (SS) frente aos conjugados 1, 2 e 3 submetidos à temperatura de 50°C após o teste de Elisa do ponto “0”	82
Figura 24	Análise conformacional dos conjugados por fluorescência	83
Figura 25	Análise dos valores de absorbância a 450 nm obtidos utilizando os conjugados diluídos em Guardian™ e conjugado do kit (-20°C), frente às amostras de soros caninos positivos e negativos para leishmaniose	86
Figura 26	Análise do conjugado 2. Análise conformacional do conjugado 2 e suas frações por fluorescência	88
Figura 27	Espectros de intensidade de fluorescência da HRP em diferentes concentrações de metaperiodato de sódio.....	89

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Valores de mobilidade eletroforética (Rf), massa molecular (MM) e área das bandas eletroforéticas das etapas do processo de purificação do soro hiperimune para obtenção da IgG, observadas na SDS-PAGE 7,5% e gerados pelo programa <i>ImageMaster</i> ®	57
Tabela 2	Valores de mobilidade eletroforética (Rf), massa molecular (MM) e área das bandas eletroforéticas das etapas do processo de purificação do soro hiperimune para obtenção da IgG, observadas na SDS-PAGE 12% e gerados pelo programa <i>ImageMaster</i> ®.	59
Tabela 3	Concentração proteica em todas as etapas do processo de obtenção da IgG através da quantificação pelo método BCA.	61
Tabela 4	Relação Molar (HRP/IgG) dos conjugadas obtidos utilizando três concentrações diferentes de NaIO ₄ e duas concentrações diferentes de NaBH ₄ . Quantificação de proteínas totais presentes nos conjugados pelo método de BCA	63
Tabela 5	Padrões de Massa Molecular utilizados na curva de calibração da Protein Pak	65
Tabela 6	Valores de área e volumes de retenção após análise cromatográfica dos 4 conjugados	67
Tabela 7	Correlação entre o tempo de armazenamento do conjugado a 50°C ou a 37°C e a equivalência à temperatura ambiente e a 4°C	76
Tabela 8	Valores de sensibilidade e especificidade dos testes de Elisa utilizando os conjugados 1, 2 e 3 submetidos a temperaturas de 4°C e 37°C em placas estocadas a -20°C (<i>kit</i>) e placas estocadas a 4°C	85

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Humana Adquirida
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AP	Fosfatase alcalina
BSA	Albumina sérica bovina
BPF	Boas práticas de fabricação
CECAL	Centro de criação de animais de laboratório
CGLAB	Coordenação Geral de Laboratórios
DAT	Teste de aglutinação direta
DC	Dicroísmo circular
DEAE	<i>Diethylaminoethyl</i> - Dietilaminoetil
DERED	Departamento de Reativos para Diagnóstico
DO	Densidade ótica
DPP	<i>Dual Path Plataform</i> – Plataforma de duplo percurso
E	Especificidade
EIA – EIE	<i>Immunesorbent assay</i> - Ensaio imunoenzimático
EL	Espalhamento de luz
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i> - Ensaio imunoadsovente ligado à enzima
EL	Espalhamento de luz inicial
Fab	Fragmento AB
FAST	<i>Fast Agglutination Screening Test</i> – Teste de aglutinação rápida
Fc	Fragmento cristalizável
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
GO	Glicose oxidase
HCV	Vírus da hepatite C
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HPLC	<i>High Performace Liquid Chromatography</i> - Cromatografia líquida de alto desempenho
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i> - Peroxidase de raiz-forte
IDRM	Intradermo reação de Montenegro
IEF	Focalização Isoelétrica
IEX	<i>Ion exchange chromatography</i> - Cromatografia de troca iônica

IFI	Imunofluorescência Indireta
Ig	Imunoglobulina
IgA	Imunoglobulina A
IgD	Imunoglobulina D
IgE	Imunoglobulina E
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
INCQS	Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
LAEAN	Laboratório de Experimentação Animal
LAMAM	Laboratório de Macromoléculas
LATED	Laboratório de Tecnologia Diagnóstica
LT	Leishmaniose Tegumentar
LV	Leishmaniose Visceral
MM	Massa molecular
MS	Ministério da Saúde
NAT	<i>Nucleic Acid Test</i> – Teste do Ácido Nucleico
OMS	Organização Mundial de Saúde
PBS	Tampão Fosfato de Sódio
PBS-T	Tampão Fosfato de Sódio com Tween 20
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> - Reação da polimerase em cadeia
pH	Potencial Hidrogeniônico
pI	Ponto Isoelétrico
POP	Procedimento Operacional Padronizado
q.s.p	Quantidade suficiente para
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
RIFI	Reação de imunofluorescência indireta
S	Sensibilidade
S	Sedimentação
SDS	<i>Sodium dodecyl sulphate</i> - Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	<i>Sodium Dodecyl Sulphate Poliacrilamye Gel Electrophorese</i> – Eletroforese em Gel de Poliacrilamida com Dodecil Sulfato de Sódio
SEC	<i>Size exclusion chromatography</i> - Cromatografia de exclusão e peneiração molecular

SEICA	Seção de Insumos, Conjugados e Apoio
SEPRO	Seção de Protozoários
SFM	Sistema fagocítico mononuclear
SVS	Sistema de Vigilância em Saúde
T.A.	Temperatura ambiente
TCA	Ácido tricloro acético
TDA	Tampão diluente da amostra
TMB	Tetrametilbenzidina
TraLd	Teste rápido anticorpo anti- <i>Leishmania donovani</i>
WB	Western Blot
WHO	World Health Organization
VN	Verdadeiro negativo
VP	Verdadeiro positivo
V/V	Volume por volume

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
1.1 LEISHMANIOSE	18
1.2 CICLO DE TRANSMISSÃO E ASPECTOS BIOLÓGICOS	20
1.3 EPIDEMIOLOGIA	22
1.4 DIFERENTES MÉTODOS IMUNOLÓGICOS DE DETECÇÃO DA DOENÇA	23
1.5 REATIVOS PARA DIAGNÓSTICO EM BIO-MANGUINHOS	25
1.6 PRODUÇÃO DE INSUMOS PARA <i>KIT</i> DIAGNÓSTICO – LEISHMANIOSE CANINA	27
1.6.1 Imunoglobulinas	27
1.6.1.1 <i>Estrutura das imunoglobulinas</i>	28
1.6.2 Peroxidase de Raiz Forte	30
1.7 ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO - LEISHMANIOSE CANINA	32
1.8 TÉCNICAS APLICADAS NA PRODUÇÃO E VERIFICAÇÃO DA QUALIDADE DE CONJUGADOS	34
1.8.1 Métodos de Conjugação	34
1.8.2 Avaliação do conjugado por Espectropolarimetria – Dicroísmo Circular (DC)	36
1.8.3 Avaliação do conjugado por espectrometria de fluorescência e espalhamento de luz	37
1.9 JUSTIFICATIVA	39
2 OBJETIVOS	40
3 METODOLOGIA	41
3.1 OBTENÇÃO DAS IMUNOGLOBULINAS	41
3.1.1 Imunização dos animais e obtenção de soro hiperimune (anti-IgG canina).....	41
3.1.2 Precipitação das imunoglobulinas por sulfato de amônia	42
3.1.3 Dessalinização e purificação das imunoglobulinas	43
3.1.4 Análise da homogeneidade proteica das frações através da eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)	43
3.1.5 Quantificação Proteica	44
3.1.6 Determinação do ponto isoeletrico por Focalização Isoeletrica em gel de poliacrilamida (IEF-PAGE)	44

3.2 PRODUÇÃO DO CONJUGADO (IgG-HRP)	45
3.2.1 Reação de oxidação da enzima peroxidase	45
3.2.2 Reação de Conjugação	46
3.3 PADRONIZAÇÃO DO ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO (ELISA) UTILIZANDO O ESTABILIZANTE COMERCIAL GUARDIAN™	47
3.4 AVALIAÇÃO IMUNOLÓGICA DOS CONJUGADOS 1, 2 e 3	48
3.5 ENSAIOS DE ESTABILIDADE ACELERADA DO CONJUGADO	49
3.6 ANÁLISE CONFORMACIONAL DOS CONJUGADOS	50
3.6.1 Avaliação por cromatografia de exclusão e peneiração molecular	50
3.6.2 Avaliação do conjugado por dicróismo circular	50
3.6.3 Avaliação do conjugado por espectrometria de fluorescência e espalhamento de luz	51
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
4.1 SORO HIPERIMUNE DE CABRA ANTI-IgG CANINA	52
4.2 DESSALINIZAÇÃO E PURIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS	52
4.3 ANÁLISE DA IMUNOGLOBULINA POR SDS-PAGE.....	54
4.4 DETERMINAÇÃO DO pI POR FOCALIZAÇÃO ISOELÉTRICA EM GEL DE POLIACRILAMIDA	59
4.5 QUANTIFICAÇÃO DA IMUNOGLOBULINA PELO MÉTODO DE BCA	61
4.6 OBTENÇÃO DOS CONJUGADOS QUANTO À CONCENTRAÇÃO DE METAPERIODATO DE SÓDIO E BOROHIDRETO DE SÓDIO.....	62
4.7 ANÁLISE DO PERFIL CROMATOGRÁFICO DOS CONJUGADOS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE EXCLUSÃO E PENEIRAÇÃO MOLECULAR	64
4.8 ANÁLISE CONFORMACIONAL DOS CONJUGADOS	67
4.9 DENATURAÇÃO FÍSICA DOS CONJUGADOS POR TEMPERATURA	69
4.10 CARACTERIZAÇÃO IMUNOLÓGICA DOS CONJUGADOS	72
4.11 PADRONIZAÇÃO DO ENSAIO IMUNOLÓGICO PARA TESTES DE ESTABILIDADE ACELERADA	73
4.12 TESTE DE ESTABILIDADE ACELERADA DOS CONJUGADOS	74
4.12.1 Elisa dos conjugados mantidos a 4°C	76
4.12.2 Elisa dos conjugados mantidos a 37°C	79
4.12.3 Elisa dos conjugados mantidos a 50°C	81

4.13 COMPARAÇÃO ENTRE OS ESTABILIZANTES PBS/GLICEROL E GUARDIAN™.....	83
4.13.1 Análise conformacional	83
4.13.2 Teste de ELISA	84
4.14 ANÁLISE DAS FRAÇÕES REFERENTES AOS PICOS DO CONJUGADO 2 ORIUNDAS DA CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE EXCLUSÃO E PENEIRAÇÃO MOLECULAR	87
4.15 ANÁLISE CONFORMACIONAL DA HRP NATIVA E OXIDADA POR METAPERIODATO DE SÓDIO	89
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	90
6 CONCLUSÕES	92
REFERÊNCIAS	93
ANEXO A - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DE UM TESTE EIE PARA DETERMINAÇÃO DA REPRODUTIBILIDADE E ESTABILIDADE DOS CONJUGADOS 1, 2 E 3 MANTIDO EM DIFERENTES TEMPERATURAS (4°C, 37°C e 50°C)	105
ANEXO B - CURVA DE CALIBRAÇÃO DACOLUNA PROTEIN PAK	106

1 INTRODUÇÃO

1.1 LEISHMANIOSE

As leishmanioses formam um conjunto de doenças infecto-parasitárias de evolução crônica. Esta doença consiste de quatro síndromes clínicas principais: Leishmaniose Cutânea ou Tegumentar (LT), Leishmaniose Muco-cutânea, Leishmaniose Visceral (LV) ou calazar e Leishmaniose Dermal Pós-Calazar (CHAPPUIS *et al.*, 2007). No caso da LT a infecção acomete pele e mucosas e no caso da LV pode atingir órgãos internos, sendo potencialmente fatal para o homem. Esta enfermidade é um grande problema de saúde pública e apresenta taxa de letalidade que pode alcançar 10% quando não se institui o tratamento adequado (WHO, 2010).

A primeira descrição das leishmanioses pode ser atribuída a Russel, que em 1756 relatou um caso de um paciente na Turquia com lesão cutânea única, sugestiva da doença. Em 1885, Cunningham observou a presença de microrganismos em material de biopsia de lesão de um paciente com Botão do Oriente, como era chamada a doença no Oriente médio. Em 1903, Leishman, na Índia, identificou o parasito no baço de um paciente. Neste mesmo ano, Ross criou o gênero *Leishmania*, e Wright classificou como *Leishmania tropica* o agente etiológico do botão do Oriente (DONOVAN, 1903, GREVELINK; LERNER, 1996).

A Leishmaniose é causada por mais de 20 espécies de *Leishmania* que acometem humanos, animais silvestres e domésticos das regiões quentes e menos desenvolvidas. É transmitida para o homem por aproximadamente 30 diferentes espécies de flebotomíneos. A doença é uma zoonose, embora seja considerado que a leishmania realize um ciclo silvestre, outro peridoméstico, ou mesmo doméstico, quando o homem invade o *habitat* silvestre para atividades econômicas ou domésticas, sugerindo uma antroponose. Em todos estes casos há, também, a adaptação do vetor, o flebotomíneo (MARZOCHI, 1992). Esta zoonose grave afeta milhões de cães na Europa, Ásia, Norte da África e América do Sul (DUPREY *et al.*, 2006).

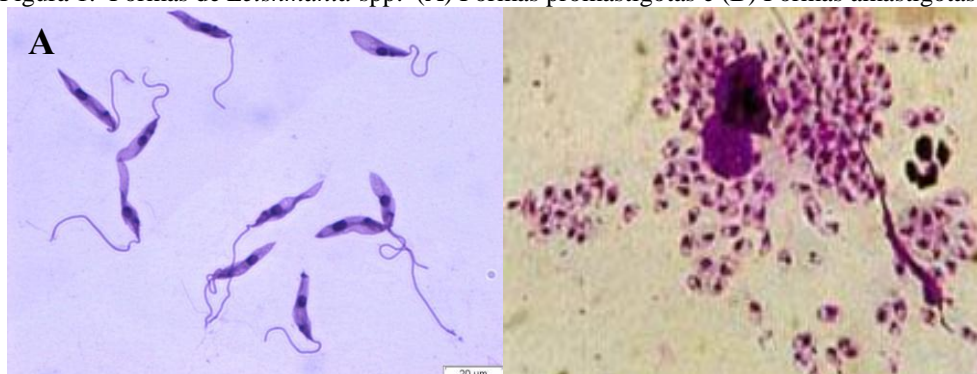
Existe uma enorme dificuldade na classificação das espécies do gênero *Leishmania*, devido à grande semelhança morfológica entre elas. Inicialmente, as espécies foram identificadas em função do aspecto clínico das doenças, assim, Lainson e Shaw reuniram as espécies em três complexos: *L. braziliensis*, *L. mexicana* e *L. donovani*. Atualmente, a classificação das espécies deste gênero baseia-se em características clínicas e

epidemiológicas, apoiada por aspectos biológicos, bioquímicos e moleculares (SOUZA, 2002).

No Brasil, o agente etiológico é a *L. chagasi*, pertencente ao complexo *Leishmania (Leishmania) donovani* (LAINSON; SHAW, 1987, GONTIJO; MELO, 2004). Esta espécie é semelhante a *L. infantum* encontrada em alguns países do Mediterrâneo e da Ásia. Existe uma grande polêmica em torno da origem da LV no Novo Mundo – se ela foi introduzida recentemente, na época da colonização europeia e causada pela espécie *L. infantum*, ou há vários milhões de anos, juntamente com a introdução dos canídeos, devendo a espécie ser classificada como *L. chagasi*. Os relatos de altas taxas de infecção em canídeos originários da Amazônia sugerem a origem autóctone (LAINSON *et al.*, 1987). Entretanto, estudos utilizando técnicas bioquímicas e moleculares consideram a *L. chagasi* e a *L. infantum* uma única espécie e aceitam a hipótese de origem recente nas Américas (MAURICIO; STOHARD; MILES, 2000).

A *Leishmania* é um protozoário, parasito intracelular, do gênero *Leishmania*, pertencente à família Trypanosomatidae e a ordem Kinetoplastida que caracteriza-se por apresentar mitocôndria única, que possui uma porção rica em kDNA (material genético mitocondrial), denominado cinetoplasto (GRIMALDI Jr; TESH, 1993). São parasitos heteroxenos, ou seja, possuem dois hospedeiros durante seu ciclo de vida, um invertebrado, no qual o parasito se desenvolve no tubo digestivo e outro vertebrado, que se desenvolvem nos tecidos, principalmente, em células do sistema fagocítico mononuclear (SFM). O parasito apresenta duas formas principais durante seu ciclo vital, a promastigota e amastigota, em função da presença ou não de flagelo exposto (PESSOA, 1982, MARZOCHI, 1992). A forma promastigota possui corpo alongado e móvel devido à presença do flagelo livre (Figura 1A) e a forma amastigota possui pequenas dimensões, contorno ovóide, corpo achatado, pouco citoplasma e núcleo relativamente grande, redondo e excêntrico (Figura 1B) (REY, 2001).

Figura 1. Formas de *Leishmania* spp. (A) Formas promastigotas e (B) Formas amastigotas



Fonte: Souza, 2002.

Fonte: Atlas de parasitologia Clínica Viqar Zaman, 1979.

1.2 CICLO DE TRANSMISSÃO E ASPECTOS BIOLÓGICOS

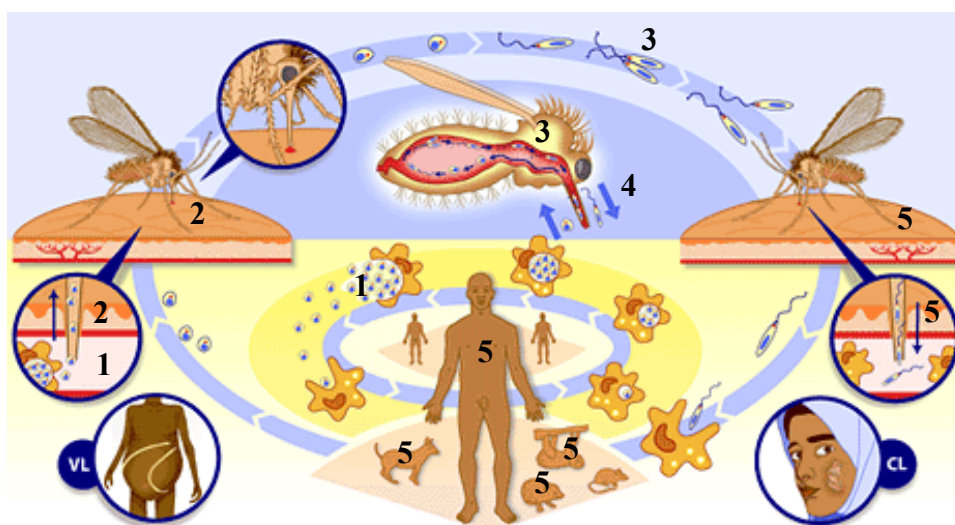
A principal forma de transmissão do parasita para o homem e outros hospedeiros mamíferos é através da picada de fêmeas de dípteros da família Psychodidae, sub-família Phlebotominae, conhecidos genericamente por flebotomíneos. A *Lutzomyia* (*Lutzomyia*) *longipalpis* é a principal espécie transmissora da *L. chagasi* no Brasil (SANTOS *et al.*, 1995, GONTIJO; MELO, 2004). O vetor contrai as formas amastigotas do parasito, contidas em células do SFM do hospedeiro infectado, ao fazer seu repasto sanguíneo. As formas amastigotas se diferenciam em formas promastigotas no aparelho digestivo do flebótomo, que se multiplicam e ficam armazenadas na cavidade bucal do inseto. Conseqüentemente, em seu próximo repasto sanguíneo, este flebótomo irá transmitir as formas promastigotas para o hospedeiro vertebrado que pode ser o homem ou outros mamíferos como preguiças, gambás, roedores, raposas e até mesmo cães domésticos, tornando estes hospedeiros fontes de infecção para outros flebótomos, dando continuidade ao ciclo (Figura 2).

Os hospedeiros silvestres da *L. chagasi* até agora conhecidos são as raposas e os marsupiais. O fato de estes animais possuírem hábitos sinantrópicos poderia promover a ligação entre os ciclos silvestre e doméstico. No ambiente doméstico, o cão (*Canis familiaris*) é o reservatório envolvido na manutenção do ciclo zoonótico predominante em várias regiões do país (BRASIL, 2003). O diagnóstico clínico da Leishmaniose Visceral Canina (LVC) é precário e complexo, pois os sinais clínicos da doença são variáveis e inespecíficos, comuns a outras enfermidades que acometem o cão. A imunossupressão causada por *Leishmania* pode gerar infecções oportunistas, dificultando do mesmo modo o diagnóstico da LVC (SILVA, 2007).

Dependendo da fase da doença e das condições imunológicas, muitos cães infectados apresentam-se assintomáticos. Entretanto, já foi demonstrado que cães infectados, mesmo assintomáticos, são fontes de infecção para os flebotomíneos e, conseqüentemente, têm papel ativo na transmissão de *Leishmania* (PALATNICK DE SOUZA *et al.*, 2001). Naturalmente, tanto a resposta imune humoral como a celular estão envolvidas, e a gravidade e variedade dos sinais clínicos da doença dependem do equilíbrio entre esses dois sistemas (POCAI *et al.*, 1998; FEITOSA *et al.*, 2000). Usando técnicas sorológicas, imuno-histoquímicas e reação de sensibilidade tardia, é possível avaliar a característica e o tipo de resposta imune que é envolvida e, dessa forma, definir o estado imune dos cães (NOGUEIRA; ODORIZZI; NAKAMURA, 2007).

Figura 2. Ciclo biológico e modo de transmissão da *Leishmania* spp.

1 - Formas amastigotas no SFM do hospedeiro. 2 - O vetor contrai as formas amastigotas do parasito ao fazer o repasto sanguíneo no hospedeiro. 3 - As formas amastigotas, se diferenciam em formas promastigotas. 4 - As formas promastigotas são multiplicadas e armazenadas na cavidade bucal do vetor. 5 - Transmissão das formas promastigotas aos hospedeiros vertebrados, dando continuidade ao ciclo.



Fonte: Organização Mundial da saúde (2008)

1.3 EPIDEMIOLOGIA

A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que as leishmanioses ocorram em 88 países distribuídos em quatro continentes, onde a maior incidência é observada em regiões tropicais e subtropicais. Desse total, 90% dos casos ocorrem em países como: Brasil, Bolívia,

Peru, Irã, Índia, Síria, Afeganistão e Arábia Saudita, e em alguns países africanos (WHO, 2006).

Dentre os 88 países endêmicos, 72 são considerados países “em desenvolvimento” e treze estão na lista dos menos desenvolvidos. Cerca de 12 milhões de pessoas no mundo estão infectadas e há um total de 350 milhões de indivíduos sob risco de contrair a infecção, que está classificada pela OMS entre as seis maiores endemias humanas devido a sua alta incidência e capacidade de produzir deformações (ZAVERUCHA, 2005, GONTIJO; CARVALHO, 2003, WHO, 2010).

Estima-se que anualmente ocorram 2 milhões de novos casos, embora somente 600 mil sejam relatados oficialmente e que cerca de 60 mil mortes por ano sejam devidas às leishmanioses (WHO, 2010). No sul da Europa a co-infecção com o vírus da imunodeficiência humana (HIV) agrava ainda mais a situação da LV. Neste continente, de 25 a 70% dos casos de LV em adultos estão relacionados com a infecção por HIV (WHO, 2010).

No Brasil nos últimos dez anos, apesar dos recursos de tratamento intensivo e das rotinas estabelecidas para o tratamento específico da LV, constatou-se aumento na letalidade da doença em diversas regiões do país, alcançando a letalidade média de 5,8% nos últimos quatro anos. Um dos principais fatores que contribuem para o aumento dessa letalidade é o diagnóstico tardio, razão pela qual a o Programa de Vigilância e Controle da LV tem como principal objetivo a redução do número de casos e de óbitos por meio do diagnóstico e do tratamento precoces. Além disso, o Ministério da Saúde (MS), na perspectiva de reduzir a letalidade por leishmaniose, tem implementado as ações de vigilância e assistência ao paciente com LV (BRASIL, 2011).

Recentemente, os Ministérios da Saúde do Mercosul assinaram sete acordos que estabelecem ações integradas para o controle e prevenção de doenças. Os documentos visam contribuir para a diminuição no número de casos e óbitos da leishmaniose, tuberculose, dengue, síndrome da imunodeficiência adquirida (HIV/AIDS) e doenças crônicas não transmissíveis na região. O documento prevê o intercâmbio de informações epidemiológicas para o controle e vigilância das leishmanioses nos países do bloco, além de fortalecer a capacidade dos estados partes e associados do bloco para o diagnóstico laboratorial das doenças (MS, 2013).

1.4 DIFERENTES MÉTODOS IMUNOLÓGICOS DE DETECÇÃO DA DOENÇA

A LVC pode ser diagnosticada indiretamente por métodos sorológicos ou técnicas de imunodiagnóstico. Os métodos sorológicos são os mais empregados em inquéritos epidemiológicos (LEAL, 2009).

O teste **de hipersensibilidade tardia ou teste de intradermorreação de Montenegro** (IDRM) utiliza a técnica na qual se injeta 0,1 mL de extrato solúvel de parasitos mortos na face interna do antebraço e procede-se a leitura após 48 a 72 horas. As endurações com diâmetro superior a 5 mm são consideradas positivas. Esse teste não tem bom desempenho para o diagnóstico da LVC, pois a resposta celular contra *Leishmania* não é bem evidenciada durante o curso da infecção (MEDEIROS; NASCIMENTO; HINRICHSEN, 2005).

A maioria dos testes sorológicos utiliza antígenos de promastigotas obtidos em culturas, o que pode comprometer a especificidade do teste devido a possibilidade de reações cruzadas com outras espécies da família Trypanosomatidae (DESJEUX, 2004).

Os antígenos purificados têm melhor desempenho no diagnóstico que os antígenos brutos, mas sua preparação requer métodos de purificação sofisticados. Uma alternativa é a produção de antígenos recombinantes, cujo desenvolvimento foi incrementado na última década. Muitos já foram disponibilizados para o diagnóstico da LV humana e/ou canina.

A **reação de imunofluorescência indireta (RIFI)** utiliza como antígeno promastigotas de várias espécies do gênero *Leishmania* fixadas em lâmina. Pode ser usada para pesquisa de imunoglobulina do tipo M (IgM) ou imunoglobulina do tipo G (IgG), mas está suscetível às reações cruzadas com diversos outros agentes que infectam os cães. Em regiões de ocorrência da LT e doença de Chagas esse teste pode não ser a melhor opção para o diagnóstico da LVC, se usado isoladamente. Contudo, é bastante utilizado em inquéritos soro epidemiológico e em programas de controle da doença (BRASIL, 2003).

O **teste de aglutinação direta (DAT)** foi desenvolvido, inicialmente, para o diagnóstico da LV humana, mas tem sido usado em caráter experimental para o diagnóstico da LVC. Sua execução é simples e o teste é quantitativo, porém requer longo período de incubação (18 horas), o que pode ser um fator limitante do seu uso (KAR, 1995, CABREIRA, 1999).

Outro teste, muito semelhante ao DAT, é o **fast agglutination-screening test (FAST)**, também chamado de teste de aglutinação rápida, cujo período de incubação é de três horas (SILVA *et al.*, 2005). O FAST é apenas qualitativo e seu desempenho, associado à facilidade

de execução, o torna um bom candidato como teste de triagem da LV canina (SILVA *et al.*, 2005)

O **ensaio de imunoadsorção enzimática (Elisa)** é um teste rápido, de fácil execução e leitura. Tem boa sensibilidade e especificidade, permitindo o processamento de grande número de amostras simultaneamente. Também vem sendo utilizado em programas de controle e em estudos epidemiológicos (BRASIL, 2003). As possíveis reações cruzadas podem ser minimizadas pelo uso de antígenos purificados ou recombinantes. A leitura automatizada elimina erros de interpretação e torna a execução do teste mais simples.

A técnica de **Western blot (WB)** é descrita como a mais sensível e específica para detecção da infecção canina, tendo desempenho superior a RIFI ou Elisa. Em 2006, um estudo com infecção experimental em cães revelou que o WB foi capaz de discriminar animais na fase de infecção recente ou tardia. Bandas imunodominantes foram detectadas indicando, inclusive, o prognóstico negativo para animais cujo parasitismo persistiu após o tratamento. Isso sugere que essa técnica pode ser usada como preditora da infecção e do parasitismo no cão (TALMI *et al.*, 2006).

O **teste imunocromatográfico DPP** (plataforma de duplo percurso) é um teste qualitativo para detecção de anticorpos anti-*Leishmania* que utiliza a proteína recombinante K39 (rK39) como antígeno. Esta proteína é o produto de um gene clonado a partir de *L. chagasi* e que contém uma repetição de 39 aminoácidos conservados entre as espécies viscerotrópicas de *Leishmania* (*Leishmania donovani*, *L. infantum* e *L. chagasi*). A presença de anticorpos anti-rK39 é indicativo de infecção, e ainda não foi relatado a reatividade com outros tripanosomatídeos (BURNS JR *et al.*, 1993, BISUGO *et al.*, 2007).

Uma das falhas apontadas no controle da LVC é o longo intervalo de tempo entre o diagnóstico e a retirada dos cães positivos do ambiente, favorecendo a transmissão da doença (LIRA *et al.*, 2006). Segundo Queiroz Jr (2011), novas alternativas de diagnóstico são necessárias para auxiliar no controle desta enfermidade e o uso do teste DPP® para triagem e o Elisa, de Bio-Manguinhos como teste para confirmação da doença, pode ser um recurso para obtenção de resultados mais eficientes, precisos e confiáveis do diagnóstico da LVC, impedindo que reservatórios transmitam o parasita.

Segundo Leal (2009), o diagnóstico inicial da LVC deve ser realizado com critério, empregando mais de uma técnica para triagem e confirmação. Devem-se considerar vários parâmetros como o diagnóstico epidemiológico, clínico, parasitológico, sorológico e exames complementares.

1.5 REATIVOS PARA DIAGNÓSTICO EM BIO-MANGUINHOS

O Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos (Bio-Manguinhos) é a unidade da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) responsável pela produção de vacinas, reativos e biofármacos voltados para atender prioritariamente às demandas da saúde pública nacional, através da vinculação direta de sua produção a alguns programas nacionais como o de controle de endemias e agravos da Fundação Nacional de Saúde (Funasa) e o de doenças sexualmente transmissíveis, ambos do MS (FIOCRUZ, 2011).

A produção de reativos para diagnóstico em Bio-Manguinhos foi iniciada na década de 1980. Com o passar dos anos, a linha de produtos foi ampliada em função da demanda do Ministério da Saúde. Bio-Manguinhos oferece ampla linha de *kits* para diagnóstico de doenças como Leptospirose, Leishmaniose Visceral, Doença de Chagas e Aids, entre outras (MEDEIROS, 2004). Atualmente o Instituto entrega aos diversos programas do Ministério da Saúde cerca de cinco milhões de reações/ano. Porém as competências de Bio-Manguinhos vão além da produção de imunobiológicos. O investimento contínuo em pesquisa, desenvolvimento e inovação são outra marca do Instituto, assim como o domínio de tecnologias de ponta e avançados processos de produção. Parcerias com outras instituições garantem acordos de transferência de tecnologia e de desenvolvimento tecnológico, contribuindo para a evolução dos projetos do Instituto (ALFOB, 2011).

Os reagentes para diagnóstico, um dos produtos fabricados por Bio-Manguinhos, utilizam reações químicas, bioquímicas, imunológicas ou biológicas *in vitro*, para obter resultados de apoio às avaliações clínicas em pacientes. Essas reações são obtidas através de interações entre antígenos e anticorpos. Os antígenos são obtidos a partir de vírus, bactérias, fungos, células e outros. Os reagentes para diagnóstico laboratorial têm ainda função importante para a saúde pública, na vigilância epidemiológica, através da identificação e monitoramento de doenças, e na avaliação da qualidade de sangue em Serviços de Hemoterapia (FIOCRUZ, 2005).

O processo de produção dos reagentes para diagnóstico deve atender os requisitos de Boas Práticas de Fabricação (BPF): instalações adequadas e validadas, equipamentos calibrados, validados e dedicados por linha de produção, insumos certificados, documentação do processo produtivo lote a lote (dossiê de produção), uso de procedimentos operacionais padronizados (POP) em todas as atividades relacionadas à produção, pessoal qualificado e permanentemente submetido a capacitação entre outros. O produto deve estar registrado pela

autoridade regulatória, que no Brasil é a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Os lotes de produção devem ser submetidos obrigatoriamente a testes de controle de qualidade pelo produtor e em instalações independentes das da área de produção (MEDEIROS, 2004).

O processo de produção de Bio-Manguinhos deve atender aos requerimentos da Vigilância Sanitária que tem como objetivo eliminar, diminuir ou prevenir riscos à saúde, bem como intervir nos problemas sanitários decorrentes do meio ambiente, da produção e circulação de bens e da prestação de serviços de interesse da saúde, abrangendo o controle de bens de consumo que, se relacionem com a saúde, compreendidas todas as etapas e processos, dos insumos e das tecnologias, da produção ao consumo e o controle da prestação de serviços que se relacionam direta ou indiretamente com a saúde (ANVISA, 2011).

Para atender as demandas do Ministério da Saúde e as exigências da Vigilância Sanitária nos últimos cinco anos, a linha de reativos vem sendo ampliada, com a introdução de novos *kits* e apresentações, de acordo com as necessidades nacionais. Sua importância crescente no portfólio pode ser constatada pelo fornecimento de uma quantidade recorde por Bio-Manguinhos: cerca de 6,1 milhões de testes, o que representa aumento de 39% em relação a 2009. Bio-Manguinhos também contribuiu para o fortalecimento dos laboratórios da rede de DST/AIDS, do Ministério da Saúde (BIO-MANGUINHOS, 2010).

As principais tecnologias para diagnóstico laboratorial atualmente em uso podem ser divididas, de uma forma geral, em três grupos: 1 – **métodos convencionais**, em geral de menor conteúdo tecnológico, fácil utilização, menor preço e, por conseguinte, usados em maior escala, como a Aglutinação, a Imunofluorescência e o Elisa. Ainda neste grupo enquadram-se os ensaios *Western Blot* e *Dot Blot*, que, no entanto, possuem maior conteúdo tecnológico, custo e complexidade de produção e realização; 2 – os **testes rápidos**, de tecnologias mais recentes, são de utilização simples, leitura fácil e, dependendo de seu tipo e finalidade, com grandes variações de preços, e 3 – **ensaios moleculares**, de alto conteúdo tecnológico, geralmente de maior sensibilidade, exigindo equipamentos especiais para sua utilização, preços altos e, por isso, utilizados em pesquisas e para testes especiais ou confirmatórios (MEDEIROS, 2004).

Recentemente, três novos ensaios foram registrados: o teste rápido DPP[®] HIV-1/2, o imunoblot rápido DPP[®] HIV-1/2 e o *Kit* NAT HIV/HCV[®] (Teste do Ácido Nucleico) para diagnóstico da AIDS e hepatite C pela tecnologia de ácido nucleico — que chega à hemorrede brasileira para ampliar a segurança das transfusões de sangue (BIO-MANGUINHOS, 2010).

Como descrito anteriormente, Bio-Manguinhos é um dos principais produtores e fornecedores de kits de reativos para diagnóstico para os laboratórios vinculados à Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS). Dessa forma, a solicitação de *kits* é realizada pela rede de laboratórios coordenada pela Coordenação Geral de Laboratórios de Saúde Pública (CGLAB/SVS). A CGLAB envolve, principalmente, os Laboratórios Centrais de Saúde Pública (Lacens), os laboratórios vinculados às Coordenações Regionais da SVS e os Laboratórios de Referência Nacional, alguns deles localizados na Fiocruz. Sendo assim, os integrantes da rede de Lacens ou de outras instituições vinculadas à SVS podem solicitar os *kits* de Bio-Manguinhos à própria CGLAB/SVS (BIO-MANGUINHOS, 2011).

Para atender à demanda analítica das amostras coletadas ao longo do processo produtivo, são realizados controles de processo que fazem parte das ações de Garantia da Qualidade, inserida na unidade de produção. As etapas de controle de processo são implementadas visando o monitoramento dos resultados gerados a fim de evidenciar não conformidades e propor ações corretivas. São atribuições do controle em processo a medição analítica dos princípios ativos e dos reagentes utilizados na produção, com o objetivo de verificar a consistência dos lotes produzidos (WHO, 1992). Os controles do ambiente e dos equipamentos também podem ser considerados parte integrante do controle em processo, segundo a Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) 17/2010 (BRASIL, 2010).

1.6 PRODUÇÃO DE INSUMOS PARA *KIT* DIAGNÓSTICO - LEISHMANIOSE CANINA

1.6.1 Imunoglobulinas

As Imunoglobulinas (Ig) são glicoproteínas que funcionam como anticorpos. Na verdade os termos anticorpos e imunoglobulinas são usados sem distinção, relacionando-se normalmente um a função e o outro a estrutura, respectivamente. As imunoglobulinas são receptoras solúveis de antígenos, sendo produzidas e ativadas pelas células B e liberadas na corrente sanguínea. Essas moléculas são responsáveis pela imunidade humoral a uma série de patologias (SCHROEDER Jr; CAVACINI, 2010). Essas proteínas suportam várias rotas da atividade do sistema imune como:

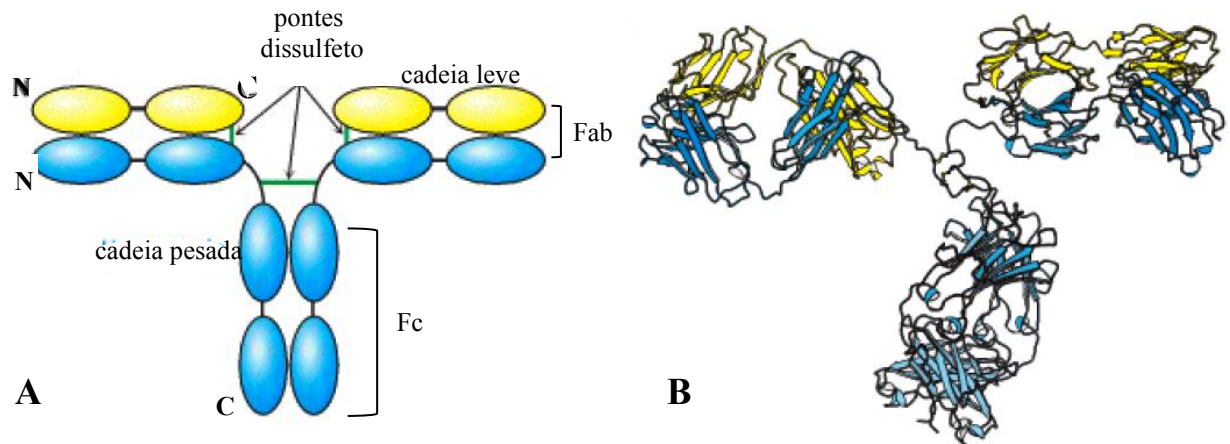
- Ligam a superfície de patógenos impedindo a interação destes com células do sangue (neutralização).
- Promovem ligação aos patógenos formando imunocomplexos que são mais facilmente reconhecidos por fagócitos (aglutinação).
- Ativam o sistema complemento e promovem a defesa através do sistema imune inato (opsonização).

1.6.1.1 Estrutura das imunoglobulinas

As imunoglobulinas G (IgGs) são quantitativamente as moléculas de anticorpos mais importantes no sangue, representando 70 a 75% do total de Ig circulante. As IgGs (massa 150 kDa) são tetrâmeros com duas cadeias pesadas (H) e duas cadeias leves (L). As cadeias pesadas são compostas por cadeias do tipo γ e são glicosiladas.

As IgGs também podem ser clivadas em fragmentos, dois fragmentos Fab e um fragmento Fc. Os fragmentos Fab são os verdadeiros ligantes de antígenos, consistem em uma cadeia leve e uma parte N-terminal da cadeia pesada. O fragmento Fc (fragmento cristalizável) é formado de duas metades do C-terminal em duas cadeias pesadas. Este segmento liga a IgG a superfícies celulares para interação com o sistema complemento e transporte de anticorpos. As imunoglobulinas são sintetizadas em formas modulares de acordo com vários domínios. As cadeias pesadas contem quatro desses domínios (V H, C H1, C H2, e CH3) e duas cadeias leves (C L e V L), onde as letras C e V designam regiões constantes ou variáveis, respectivamente (BERG; TYMOCZKO; STRYER, 2009). As pontes dissulfeto ligam as duas cadeias pesadas e também cadeias pesadas a cadeias leves. As pontes também são necessárias para estabilizar a estrutura terciária. Na região conhecida como flexível os anticorpos são extremamente móveis (KOOLMAN; RÖHM, 2005) (Figura 3).

Figura 3. Estrutura da imunoglobulina G. (A) Visão esquemática da molécula de IgG divididas em fragmentos Fc e Fab, com a cadeia pesada em azul e cadeia leve em amarelo. As setas indicam a posição das pontes dissulfeto intercadeias, N = terminal amino e C = terminal carboxílico. (B) Estrutura tridimensional da molécula de IgG contendo os domínios globulares.



Fonte: Biochemistry, Sixth Edition, 2007 WH Freeman and Company

As imunoglobulinas são formadas por domínios de aproximadamente 110 aminoácidos e são homólogos um com o outro, como resultados de duplicação gênica. Cada motivo globular contém um par de folhas beta antiparalelas, com três ou quatro segmentos polipeptídicos por camada e um *core* hidrofóbico (WARREN LEVINSON, 2010) (Figura 3).

As IgGs estão envolvidas na resposta imune secundária, e seu aumento tende a predominar nas respostas crônicas de doenças. Diante disto, o conjugado anti-IgG marcado com peroxidase, produzido a partir de soros hiperimunes, é utilizado como importante ferramenta em testes imunoenzimáticos de diagnóstico, aproveitando a especificidade destes insumos às imunoglobulinas séricas aumentadas em determinadas patologias.

Existem outras quatro classes de imunoglobulinas com funções diferentes. Cada uma das 4 classes tem a mesma cadeia leve combinada com diferentes cadeias pesadas α , δ , ϵ e μ (Figura 4):

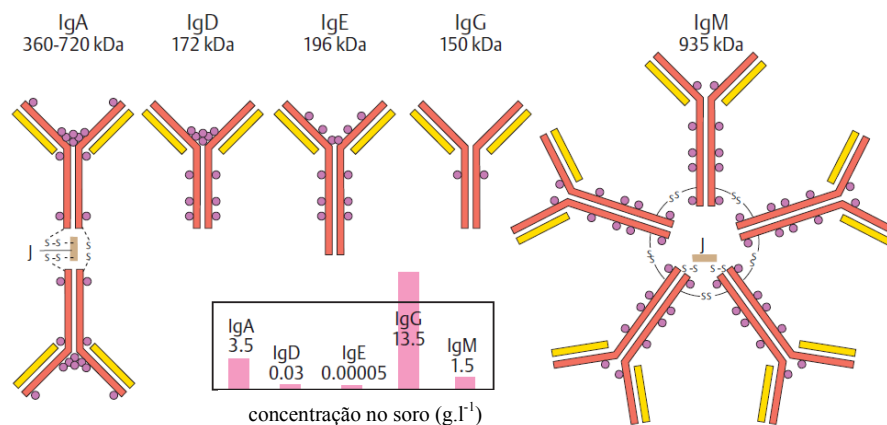
Imunoglobulina A (IgA) representa de 15 a 20% do total de imunoglobulinas do soro, possuindo cadeia pesada tipo α . Quantitativamente 90% dessa proteína está presente no soro, enquanto o restante pode ser encontrada nas secreções nasais, salivares e no leite.

Imunoglobulina D (IgD) representa 1% do total das imunoglobulinas no soro, composta de cadeia pesada do tipo δ , está presente em grande quantidade de linfócitos maduros.

Imunoglobulina E (IgE) representa menos de 1% do total das imunoglobulinas do soro, composta de cadeia do tipo ϵ , está presente em grande quantidade na membrana de mastócitos e basófilos. Este tipo de Ig sensibiliza as células da superfície da mucosa conjuntiva, nasal e brônquica.

Imunoglobulina M (IgM) representa aproximadamente 10% do total das imunoglobulinas, composta de cadeia do tipo μ , é a imunoglobulina inicial das respostas imunes.

Figura 4. Classes de Imunoglobulinas. As cinco classes de imunoglobulinas com a região constante representado em vermelho e a região variável representado em amarelo. As pontes dissulfeto também estão representadas na Figura. O dímero IgA e o pentâmero IgM possuem uma cadeia adicional as cadeias leves e pesadas. Na parte inferior são destacadas as concentrações das imunoglobulinas no soro.



Fonte: KOOLMAN; RÖHM, 2005.

1.6.2 Peroxidase de Raiz Forte

A enzima peroxidase de raiz forte (HRP) é uma glicoproteína isolada de raízes de rábano (*Amaracia rusticana*), demonstrada na Figura 5A, e pertence ao grupo das peroxidases que contém ferro protoporfirina como grupamento prostético (Figura 5B). Esta proteína consiste de uma única cadeia polipeptídica que contém quatro pontes de dissulfeto, e cerca de 18% de teor glicídico. A HRP apresenta várias isoenzimas, conforme descrito na literatura, podendo variar no teor glicídico ou na porção polipeptídica. Os glicídios mais encontrados na HRP são basicamente a galactose, arabinose, xilose, fucose, manose, manosamina e galactosamina (SHUETZ *et al*, 1997).

A massa molecular (MM) média da HRP é de aproximadamente 44 kDa, incluindo a cadeia polipeptídica (33,9 kDa), o grupamento hemina com Fe^{2+} (~ 700 Dalton) e a porção glicídica (~ 9,4 kDa). As isoenzimas de HRP apresentam ponto de isoelétrico variando entre 3,0 e 9,0.

De um modo geral, a HRP liga-se ao peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o complexo resultante [HRP- H_2O_2] pode oxidar uma grande variedade de cromógenos doadores de hidrogênio. O pH ótimo da HRP depende do substrato utilizado, mas varia entre 5,0 e 6,5, sendo que em pH 7,5 sua atividade corresponde a 84% da atividade máxima. A estabilidade das isoenzimas está na faixa de pH entre 5,0 – 9,0 (SHUETZ *et al.*, 1997).

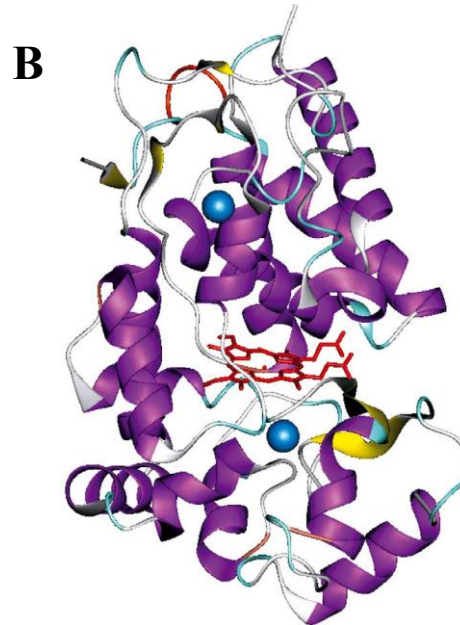
A estrutura da HRP foi determinada na década de 1990 por cristalografia de raio-X (GAJHED *et al.*, 1997). Entre os vários resíduos de aminoácidos, a enzima apresenta um resíduo de triptofano, oito de cisteína (responsável pelas quatro pontes de enxofre) e três de histidina (WELINDER, 1976). A estrutura da enzima (Figura 5B) é formada basicamente por estruturas α -hélice e uma pequena quantidade de folhas β , que compõe os dois domínios distais e proximais entre os quais o grupo heme está localizado (WELINDER; GAJHEDE, 1993; VEITCH, 2004). Tanto o grupo heme quanto os átomos de cálcio são cruciais para o funcionamento correto da enzima e a perda de um deles resultaria em instabilidade. Outra característica importante é a rede de pontes de hidrogênio, provável responsável pela estabilidade da estrutura secundária e terciária da enzima (WELINDER, 1992).

A HRP, encontrada na raiz forte, é amplamente utilizada em biologia molecular, principalmente pela sua capacidade de amplificar um sinal fraco e aumentar a detecção de uma molécula-alvo. Por exemplo, um anticorpo conjugado a HRP pode ser usado para detectar uma pequena quantidade de uma proteína específica, comumente usado em técnicas como Elisa e imuno-histoquímica. Inúmeros substratos para a HRP foram descritos e comercializados para explorar as características desejáveis de HRP (SHUETZ *et al.*, 1997). A HRP é ideal em muitos aspectos para estas aplicações, pois é menor, mais estável e seu processo de conjugação é menos dispendioso em comparação a outras proteínas, como por exemplo a fosfatase alcalina (AP) (HERMANSON, 2008).

Figura 5. (A) Representação da planta de onde se extrai a peroxidase de raiz forte, *Armoracia rusticana*. A seta demonstra a raiz da *A. rusticana*. (B) Representação tridimensional da estrutura da HRP por cristalografia de raio-X. Grupo heme (vermelho) está localizado entre a porção distal e proximal da enzima. As regiões de α -hélice e folha β estão representadas em púrpura e amarela e o átomo de cálcio em azul.



Fonte: Veitch, 2004.



Fonte: Veitch, 2004.

1.7 ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO – LEISHMANIOSE CANINA

A técnica de Elisa, desde sua primeira descrição por Engvall *et al.*, 1971, tem contribuído não só para o diagnóstico sorológico desta enfermidade (JAFFE; ZALIS, 1988), como também de outras doenças infecciosas. O método de Elisa é tão sensível quanto a RIFI no diagnóstico da leishmaniose, sendo usado em estudos de larga escala, especialmente, na versão simplificada utilizando microplacas de titulação (HOMMEL *et al.*, 1978).

A reação imunoenzimática é a base de muitos testes usados para a identificação de antígenos ou a detecção de anticorpos. O resultado do teste é determinado por observação (avaliação qualitativa) ou medida espectrofotométrica (avaliação quantitativa) de mudança de cor, produzido pela ação da enzima sobre o seu substrato (SANTOS; ROMANOS; WIGG, 2002).

O princípio do EIE baseia-se em uma reação imunológica (antígeno-anticorpo) seguida de uma etapa com antígeno ou anticorpo conjugado a uma enzima, um substrato e uma substância reveladora. Deste modo, antígenos ou anticorpos primários são adsorvidos a

uma fase sólida, usualmente uma placa de poliestireno de 96 poços. Em seguida, a superfície é lavada com uma solução tampão de bloqueio para impedir que proteínas não específicas adsorvam nessas superfícies. Posteriormente, a amostra que pode conter antígeno ou anticorpo dependendo do método empregado é incubada e o anticorpo ou antígeno não ligado à amostra, é retirado por lavagem. À superfície da placa são adicionados anticorpos ou antígenos ligados a uma enzima que na presença de um substrato e de uma solução cromógena desenvolvem cor. A intensidade da cor é proporcional à concentração do antígeno ou do anticorpo pesquisado, presente na amostra (DAVIS; PADLAN; SHERIFF, 1990).

Em Bio-Manguinhos, os primeiros *kits* de reativos para diagnóstico produzidos foram os de imunofluorescência indireta (IFI) para leishmaniose canina e humana, além do teste intradérmico com antígeno de Montenegro. A partir destes testes, foram desenvolvidos novos *kits* como Elisa, que surgiu na década de 1990 e permitiram aos laboratórios ampliar os testes de diagnóstico e inquéritos epidemiológicos. Estes produtos, produzidos por Bio-Manguinhos destinam-se prioritariamente ao atendimento das demandas dos programas públicos de controle da leishmaniose visceral e para projetos de pesquisa realizados por instituições públicas do país (BIO-MANGUINHOS, 2011).

Esse ensaio é aplicado para detecção de leishmaniose em soro ou plasma de cães. Em geral se baseia na reação de soros de cães com antígenos solúveis de *Leishmania* obtidos a partir de cultura *in vitro*, previamente adsorvidos nas cavidades de microplacas/strips (fase sólida). A seguir adicionam-se, devidamente diluídos, os soros controle do teste e as amostras a serem analisadas, que, possuindo anticorpos específicos, se fixam aos antígenos. Na etapa seguinte, ao se adicionar uma anti-imunoglobulina canina marcada com a HRP, esta se ligará aos anticorpos, caso estejam presentes. Para evidenciação da reação, utiliza-se o cromógeno tetrametilbenzidina (TMB) que pela ação da HRP com o peróxido de hidrogênio forma um composto de coloração azul turquesa que, ao se adicionar o ácido sulfúrico que interrompe a reação, passa a apresentar uma coloração amarela em caso positivo (reagente). Nas cavidades que não houver anticorpos específicos, não haverá cor, o que caracteriza uma reação negativa (não reagente).

1.8 TÉCNICAS APLICADAS NA PRODUÇÃO E VERIFICAÇÃO DA QUALIDADE DE CONJUGADOS

1.8.1 Métodos de conjugação

A conjugação é um processo que envolve a ligação de duas ou mais moléculas para formar um novo complexo com as propriedades combinadas de seus componentes. O objetivo da bioconjugação é desenvolver métodos eficientes para a modificação de proteínas e outras moléculas biológicas de modo que apresentem um alto grau de especificidade *in vitro* e *in vivo* (HERMANSON, 2008). Nenhuma técnica de conjugação universal existe até hoje, mas avanços significativos têm sido feitos para desenvolvimento de novas metodologias.

A escolha dos métodos de conjugação depende da estrutura química e da disponibilidade dos grupos funcionais presentes nos oligossacarídeos e nas proteínas, o que interfere na estrutura final do conjugado que se pretende obter. As proteínas podem ser quimicamente modificadas usando-se uma variedade de métodos. Dentre os principais: a) Conjugação específica direta, b) Conjugação específica indireta.

A única diferença entre os métodos a e b é que no primeiro caso, o polímero é introduzido diretamente na estrutura da proteína, enquanto no segundo, um espaçador hetero bifuncional é ligado primeiramente à proteína para criar um intermediário reativo, que é posteriormente conjugado com a segunda molécula. Deste modo, as macromoléculas podem ser quimicamente conjugadas usando-se diferentes reagentes (HERMANSON, 2008):

- ✓ Reagentes de conjugação de “tamanho zero”- Não acrescentam espaçadores entre as moléculas a serem conjugadas.
- ✓ Reagentes de conjugação homo bifuncionais - Compostos que apresentam sua estrutura química constituída de uma cadeia carbônica separando dois terminais contendo grupamentos reativos idênticos.
- ✓ Reagentes de conjugação hetero bifuncionais - Compostos que apresentam sua estrutura química constituída de uma cadeia carbônica que contém, em seus terminais dois diferentes grupamentos reativos, o que possibilita a conjugação com alvos diferentes nas moléculas a serem conjugadas.

As estratégias de ligação entre polissacarídeos e proteínas para a formação de glicoconjugados normalmente ocorrem numa sequência reacional composta por várias etapas.

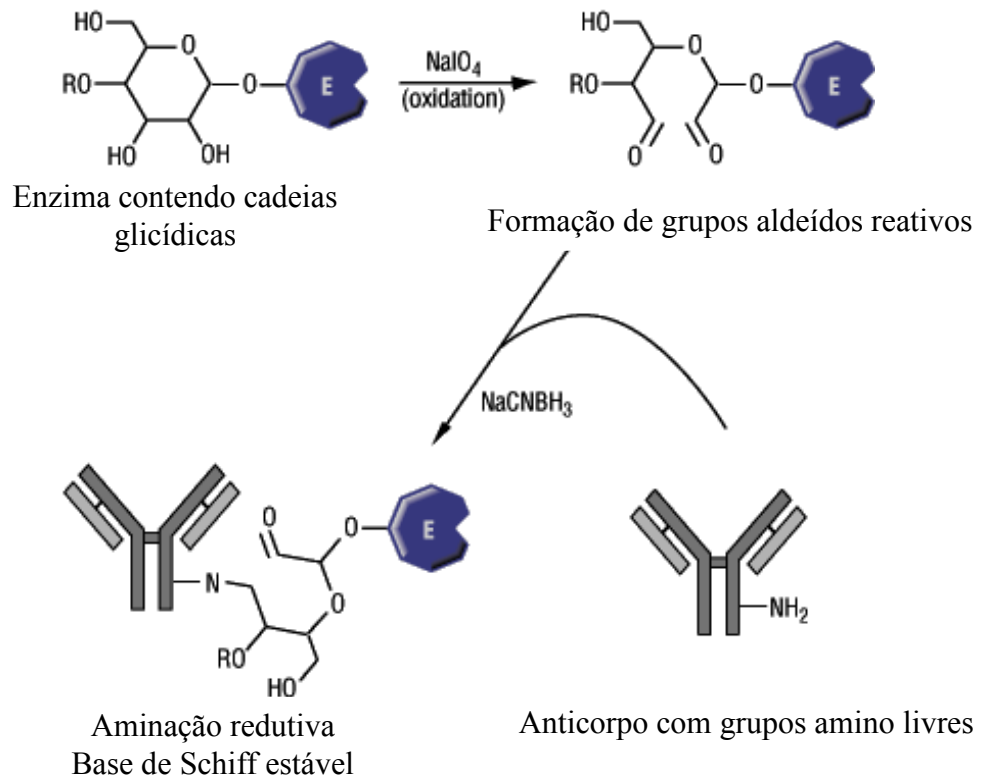
A necessidade de várias etapas está relacionada com a falta de grupamentos reativos na cadeia polissacarídica, por exemplo, que devem ser gerados, a fim de permitir o acoplamento com outras moléculas, tais como as proteínas (HERMANSON, 2008). Sabe-se que os grupamentos aldeído e cetona são alvos importantes para as reações de conjugação e, uma vez que nem sempre estão presentes em biomoléculas, eles podem ser gerados através de reações específicas.

O método mais simples de gerar grupamentos reativos em uma molécula polissacarídica é através da reação de oxirredução com metaperiodato de sódio (NaIO_4), um composto que cliva as ligações entre átomos de carbono das unidades monossacarídicas que contenham hidroxilas vicinais, gerando grupamentos aldeídos reativos. Esta reação pode ser realizada em meio aquoso, o que é desejável quando se quer obter glicoconjugados para uso biológico (HERMANSON, 2008).

Os aldeídos podem reagir com aminas primárias e secundárias, através de uma reação de desidratação, formando uma imina (base de Schiff). Por ser um composto relativamente lábil, a base de Schiff pode ser hidrolisada em meio aquoso, e embora sua formação seja favorecida em condições alcalinas, a estabilidade necessária do produto final não é garantida. Entretanto, a base de Schiff pode ser quimicamente estabilizada através do método de aminação redutiva, em que são utilizados agentes redutores tais como o borohidreto e o ciano-borohidreto de sódio. O borohidreto é capaz de reduzir não só os grupamentos aldeído, regenerando a hidroxila, como também a base de Schiff, formando uma amina secundária. Uma vez reduzida, a ligação mostra-se altamente estável e não hidrolisável em meio aquoso. A Figura 6 mostra a reação entre uma amina primária e o grupo aldeído com a formação da base de Schiff e sua posterior estabilização pelo ciano-borohidreto.

O método de aminação redutiva foi empregado pela primeira vez para a obtenção de glicoconjugados em 1981, quando Jennings e Lugowski conjugaram algumas proteínas como a albumina sérica bovina (BSA) e o toxóide tetânico aos polissacarídeos meningocócicos. Dentre as vantagens citadas para este método, estão a de ser um meio direto de ligação entre oligossacarídeos e os grupamentos amino de proteínas, sem a presença de um espaçador, já que alguns autores citam a dificuldade de padronização do acoplamento via espaçador, que resulta na formação de glicoconjugados com imunogenicidade variável (SHEN *et al.*, 2001). O método propicia a ligação entre as duas moléculas passível de ocorrer em meio aquoso, e em condições reacionais brandas, resultando em uma conjugação mais precisa (ROY *et al.*, 1984).

Figura 6. Reação de conjugação por aminação redutiva entre HRP e IgG. Os grupamentos aldeídos formados pela oxidação parcial de hidroxilas viciniais da cadeia polissacarídica da HRP reagem com grupos amina da Imunoglobulina.



Fonte: <http://www.piercenet.com/Objects/view.cfm>

1.8.2 Avaliação do Conjugado por Espectropolarimetria – Dicroísmo Circular (DC)

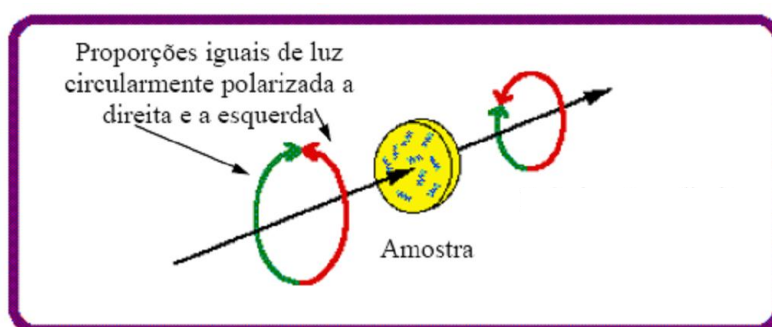
O dicroísmo circular (DC) é a diferença de absorção, da luz circularmente polarizada à esquerda e à direita. Macromoléculas biológicas, tais como proteínas, carboidratos e ácidos nucleicos, são compostas de muitas unidades opticamente ativas que exibem sinal de DC (JOHNSON, 1988). Quando tais moléculas interagem com a luz circularmente polarizada provocam uma alteração nessa luz incidente. A técnica de DC detecta exatamente a alteração através da medida da diferença da absorção da luz circularmente polarizada à esquerda e à direita, após a luz passar pela amostra. A espectropolarimetria de DC tem por função a avaliação do conteúdo de estrutura secundária de cada proteína utilizando-se a região do ultravioleta longe do visível (*far-UV*). Os espectros diferem significativamente tanto na forma quanto na magnitude para proteínas com conteúdos diferentes de α -hélices, folhas- β e

estruturas randômicas (JOHNSON, 1988). As α -hélices apresentam dois mínimos nos espectros de dicroísmo situados em 208 e 222 nm, seguido por um pico positivo em 190 nm, ao passo que as folhas- β apresentam mínimo em torno de 216-220 nm. Quanto maiores os valores de elipticidade negativa ou positiva destes picos, maior o conteúdo de estrutura secundária da proteína (JOHNSON, 1988).

A técnica de DC pode ser utilizada para detecção de mudanças conformacionais de macromoléculas que resultam da ação de temperatura, pH, variações de sal, solventes e ligantes; para estudos de composição de misturas quirais e para estudar a interação dessas macromoléculas com outras moléculas menores, especialmente aquirais (JOHNSON, 1988).

Podemos citar algumas vantagens na utilização desta técnica, como por exemplo: experimentos simples e rápidos, recuperação total da amostra, as análises são feitas em solução, entre outras (CORRÊA, 2009).

Figura 7. Desenho esquemático da absorção da luz circularmente polarizada por uma amostra



Fonte: <http://lem.iq.usp.br>.

1.8.3 Avaliação do conjugado por espectrometria de fluorescência e espalhamento de luz

O fenômeno de fluorescência é radiação emitida por um átomo ou molécula, quando esta relaxa do estado excitado para o estado fundamental. A fluorescência se baseia na propriedade apresentada por algumas moléculas de absorverem luz em um determinado comprimento de onda, e após um intervalo de tempo, emitirem luz em um comprimento de onda maior e menos energético (LAKOWICZ, 2006).

A espectroscopia de fluorescência permite estudar a dinâmica de proteínas ou mesmo de complexos proteicos através da observação de mudanças conformacionais na estrutura

terciária de proteínas (LAKOWICZ, 2006). Os aminoácidos aromáticos triptofano, tirosina e fenilalanina são os marcadores intrínsecos utilizados para o monitoramento de medidas espectroscópicas de fluorescência em proteínas. A emissão de fluorescência destes resíduos é extremamente dependente da polaridade do meio onde se encontram. Desta forma, os processos de desnaturação e dissociação de proteínas podem ser monitorados através das mudanças no espectro de emissão de fluorescência. Estas mudanças podem ser analisadas através da área espectral ou do desvio de centro de massa do espectro. O centro de massa é um parâmetro que traduz o centro de energia do espectro de emissão de fluorescência dos resíduos de triptofano e, conseqüentemente, a exposição destes resíduos ao meio aquoso (WEBER; DRICKAMER, 1983). O centro de massa espectral $\langle \nu \rangle$, quando expresso em número de ondas, é diretamente proporcional à energia de emissão, que pode ser calculado conforme a expressão abaixo:

$$\langle \nu \rangle = \frac{\sum \nu_i \cdot F_i}{\sum F_i}$$

onde F_i é a fluorescência emitida em um número de onda ν_i , sendo o somatório realizado a partir de uma grande quantidade de valores F .

Quando os resíduos de aminoácidos aromáticos se encontram em ambientes apolares como, por exemplo, no interior de proteínas, a emissão ocorre em comprimentos de onda menores e mais energéticos. Conforme a proteína é dissociada ou desnaturada, os resíduos de aminoácidos aromáticos passam a ser expostos ao solvente e, conseqüentemente, ocorre um desvio da emissão para comprimentos de onda maiores e menos energéticos (WEBER; DRICKAMER, 1983).

Para cada espectro de intensidade de fluorescência adquirido pode ser calculado o valor da área espectral e a razão A/A_0 [Área (A), Área espectral inicial (A_0)] pode ser utilizada para avaliar o grau de desnaturação da amostra.

Para se obter informações sobre o tamanho médio da partícula em solução, pode-se verificar o espalhamento de luz da amostra. Dessa forma, partículas maiores tendem a espalhar mais luz e partículas menores espalham menos luz. As amostras são excitadas a 320 nm e a luz espalhada é detectada na faixa de 300 a 340 nm, selecionados por um monocromador, e quantificada pela área correspondente aos valores de intensidade obtidos neste intervalo. A razão EL/EL_0 [espalhamento de luz (EL), espalhamento de luz inicial (EL_0)] é utilizada para avaliar a extensão da agregação e/ou desnaturação das amostras em determinadas condições. Utiliza-se o comprimento de onda de 320 nm para iluminar as amostras, pois nem proteínas nem os ácidos nucléicos absorvem luz nesse comprimento de onda (LAKOWICZ, 2006).

1.9 JUSTIFICATIVA

Na área de reativos para diagnóstico de Bio-Manguinhos vem se trabalhando com afinco para gerar em curto prazo, novos produtos para imunodiagnósticos, atividade extremamente relevante, principalmente, por se enquadrar na política do Ministério da Saúde, na área de controle e diagnóstico de doenças infectocontagiosas, melhorando desta forma, as ações do Sistema Único de Saúde dedicada a população. Dentre os *kits* de diagnóstico produzidos por Bio-Manguinhos relacionados à leishmaniose, ressalta-se a importância do Elisa, que apresenta uma ótima alternativa no diagnóstico da leishmaniose canina, devido a sua facilidade de padronização, possibilidade de diagnóstico em grande escala, melhor leitura e interpretação dos resultados quando comparados com outros testes sorológicos. Além disso, o kit EIE-LVC Bio-Manguinhos é usado como o teste confirmatório para o diagnóstico da LVC, segundo Nota Técnica nº 48 (SVS/MS) de agosto de 2011, e o TR-DPP, como o teste de triagem (BIO-MANGUINHOS, 2011).

Atualmente, a Leishmaniose Visceral tem um índice de letalidade média de 5,8%, sendo uma preocupação permanente para o Programa de Vigilância e Controle dessa doença no Brasil (BRASIL, 2011). O Ministério da Saúde, na perspectiva da redução do número de casos e de óbitos, tem implementado ações de vigilância, assistência ao paciente com LV e apoio ao aprimoramento e desenvolvimento de testes para o diagnóstico precoce.

Baseado neste panorama da alta morbidade causada pela leishmaniose e em face à crescente demanda de produção de conjugados para o mercado nacional, agravada pelo fato dos conjugados comerciais importados serem de difícil aquisição, existe uma real necessidade de se desenvolver um projeto que aprimore os processos de produção e promova a implantação de controles de processos e insumos. A otimização de técnicas e a implementação de novas estratégias para a produção de conjugados com boa especificidade, sensibilidade e estabilidade, além de possibilitar a garantia da qualidade permitem a diminuição dos custos evitando retrabalho e desperdício.

Sendo assim, esta dissertação tem como propósito garantir a viabilidade da produção dos conjugados componentes do *kit* EIE-LVC com altos níveis de estabilidade, reprodutibilidade e qualidade para posteriormente aplicar essas novas metodologias na produção de *kits* para diagnóstico em Bio-Manguinhos.

2 OBJETIVOS

Este estudo teve como objetivo principal estabelecer e otimizar estratégias de controle de processo para a produção de conjugados marcados com HRP produzidos na Seção de Insumos, Conjugados e Apoio (SEICA) no Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos (Bio-Manguinhos).

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter os soros hiperimunes;
- Purificar e analisar a homogeneidade da fração de imunoglobulinas;
- Analisar as melhores condições de conjugação das imunoglobulinas com a HRP;
- Realizar a caracterização química e físico-química da imunoglobulina e dos conjugados;
- Realizar a caracterização imunológica dos conjugados obtidos através de Elisa;
- Estabelecer testes de estabilidade acelerada nas temperaturas de 4°C, 37°C e 50°C utilizando os diferentes conjugados produzidos com três concentrações diferentes de metaperiodato de sódio e com duas concentrações diferentes de borohidreto de sódio.

3 METODOLOGIA

Previamente à realização desta dissertação, os animais foram imunizados e soro hiperimune foi obtido conforme as diretrizes da produção de insumos. Com exceção desta etapa, todas as metodologias descritas a seguir foram realizadas para o desenvolvimento desta dissertação.

3.1 OBTENÇÃO DAS IMUNOGLOBULINAS

3.1.1 Imunização dos animais e obtenção de soro hiperimune (anti-IgG canina)

Animais de médio porte (caprinos), mantidos no Centro de Criação de Animais de Laboratório (CECAL) da Fiocruz, foram inoculados com IgG canina comercial (Rockland antibodies & assays), conforme preconiza o protocolo do Procedimento Operacional Padrão (POP 1436, 2010) da SEICA referente à imunização e obtenção de antissoros em cabra. Primeiramente, a IgG comercial liofilizada foi diluída em solução salina 0,85% (NaCl 0,85%) para a concentração final de 4 mg/mL, em um volume final de 1 mL e estocada em freezer - 20°C. Para a preparação do inóculo da primeira imunização, foram utilizados 1 mL da IgG na concentração de 4 mg/mL, juntamente com 1,5 mL do adjuvante completo de Freund acrescido de 0,5 mL de solução salina. Para demais imunizações e doses de reforço, o inóculo foi preparado com adjuvante incompleto de Freund. Ao se iniciar o esquema de imunizações, foram feitas 3 inoculações quinzenais e um reforço 7 dias após a última inoculação. Após as imunizações, foi realizada uma sangria teste para a avaliação da resposta imune do animal frente ao inóculo através do método de imunodifusão radial simples (MANCINI; CARBONARA; HERMANS, 1965). O resultado do teste de imunodifusão radial (POP 1435, 2010), mostrou-se dentro do padrão requerido para o título de 1:32 (v/v). De acordo com o POP de Recebimento, Titulação e Estocagem de Soros Hiperimunes (POP 2127, 2011) seguido na SEICA/Departamento de Reativos para Diagnóstico (DERED) de Bio-Manguinhos, deve-se obter o título mínimo de 1:32 v/v em relação a IgG canina para que a

etapa de produção do conjugado possa prosseguir. Desta forma, foi solicitado ao CECAL uma sangria parcial das cabras.

Após a sangria, o sangue obtido foi distribuído em frascos contendo 500 mL. Esses frascos foram incubados em estufa a 37°C por 30 minutos, para a retração e retirada do coágulo. Em seguida, o conteúdo foi centrifugado a 1560 x g por 30 minutos a 4°C para a obtenção do soro hiperimune. Após essa etapa, foi realizada a titulação do soro obtido frente ao inóculo (IgG canina) através do método de Imunodifusão Radial Simples (MANCINI; CARBONARA; HERMANS, 1965). Esses testes foram realizados com o objetivo de determinar qualitativamente a resposta imune do soro de cabra. Para este teste foram aplicados 3,5 mL de gel de agarose (agarose 0,9% em solução Tampão Prince, pH 7,6) em lâmina de vidro, em seguida o gel foi perfurado com o auxílio de um molde de metal em forma de roseta (com um furo central e seis ao redor). O orifício central recebeu a IgG canina comercial na concentração de 4 mg/mL. O primeiro orifício da parte de cima da roseta recebeu o soro hiperimune puro obtido do animal e os demais orifícios receberam a mesma amostra do soro em diferentes diluições em PBS, a partir de 1:2 até 1:32.

3.1.2 Precipitação das imunoglobulinas por sulfato de amônia

Os soros hiperimunes de cabra com o título mínimo de 1:32 v/v foram submetidos à precipitação fracionada com sulfato de amônia de acordo com protocolo de “Precipitação de Imunoglobulina por Sulfato de Amônia a partir de Soro de Cabra” seguido na SEICA (POP 1428, 2011, ABELSON; SIMON, 1990). A primeira precipitação foi realizada com aproximadamente 1 litro de soro e o mesmo volume de solução de sulfato de amônio a 60%. O gotejamento da solução sobre o soro, em banho de gelo e sob agitação, foi feito vagarosamente. Após o gotejamento, o material permaneceu em agitação e banho de gelo por 4 horas. Ao término da incubação, o material foi centrifugado a 1560 x g por 30 minutos a 4°C. O sobrenadante foi decantado e o precipitado foi ressuscitado com água purificada para o volume inicial do soro (1 litro). A segunda precipitação foi realizada de maneira semelhante à primeira, com exceção da concentração da solução de sulfato de amônia que foi de 90% e ao final do gotejamento não houve incubação. Após a centrifugação, o sobrenadante foi decantado e o precipitado foi ressuscitado em solução tampão Tris-HCl 0,05 M, pH 8,0.

3.1.3 Dessalinização e purificação das imunoglobulinas

A amostra contendo a anti-IgG canina obtida após precipitação foi submetida a dessalinização prévia empregando a cromatografia de peneiração e exclusão molecular (SEC), e purificação empregando a cromatografia de troca iônica. As cromatografias foram realizadas no cromatógrafo Akta Purifier 100 (GE Healthcare).

Para a dessalinização foi utilizada uma coluna de SephadexTM G-25 (GE Healthcare - XK-50). A coluna cromatográfica com 370 mL, foi equilibrada em solução tampão Tris HCl 50 mM, pH 8,0 e fluxo de 35 mL/min. As frações obtidas contendo anti-IgG canina foram reunidas em uma única fração e purificadas por cromatografia de troca aniônica em coluna Poros HQ (GE Healthcare). A coluna foi equilibrada em solução tampão de eluição “A” (Fosfato de Sódio 20 mM, pH 7,0), com um fluxo de 35 mL/min e com a pressão limite estabelecida em 0,3 Mpa.

A cromatografia de troca iônica foi conduzida em gradiente descontínuo com 3 degraus: 3 volumes de coluna na ausência do tampão de eluição B (Tris-HCl 50 mM, NaCl 1 M, pH 8,0), 6 volumes de coluna em 20% de tampão de eluição B e 3 volumes de coluna em 100% de tampão de eluição B. As frações contendo IgG foram coletadas após visualização dos picos cromatográficos com leitura das absorvâncias em 220 nm e 280 nm, e armazenadas para posterior quantificação e realização da técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida contendo Dodecil Sulfato de Sódio (SDS-PAGE).

3.1.4 Análise da homogeneidade proteica através da eletroforese em gel de poliacrilamida.

Após a etapa de purificação, a homogeneidade das frações contendo a anti-IgG canina foi analisada por SDS-PAGE em condições desnaturantes, utilizando o sistema Mini Protean II (Bio-Rad), segundo Laemmli (1970). O gel de poliacrilamida foi formado por um gel de empilhamento superior – *stacking gel* (gel concentrador) e um gel separador inferior – *fractionating gel* (gel fracionador). Para a fase concentradora utilizamos uma concentração de gel T= 4% de poliacrilamida em pH 6,8, enquanto que para a fase separadora utilizamos uma concentração de gel T= 12% ou 7,5% de poliacrilamida e pH de 8,8. Previamente à eletroforese, as amostras proteicas foram fervidas a 100°C durante 5 minutos em solução

tampão de amostra (Glicerol 10%, SDS 0,6%, Tris-HCl 0,25 M, pH 6,8, 10%, azul de bromofenol 0,04%) e na ausência ou na presença de DTT (DTT 0,25 mM). Após a preparação das amostras, estas foram submetidas à eletroforese em voltagem constante de 220 V em solução tampão formada por Tris-base 25 mM, Glicina 192 mM, SDS 0,1%, pH 8,3. Para a determinação da massa molecular das imunoglobulinas por SDS-PAGE, foram utilizados padrões de proteínas de massa moleculares conhecidas (*Broad range*, Bio Rad). As bandas eletroforéticas foram reveladas com a solução contendo: Metanol: Ácido Acético: água (30:8:62, v/v/v) e o corante *Coomassie brilliant blue R 250* (0.2 %) e o gel foi descorado com a solução de metanol; ácido acético; água (30:8:62, v/v/v) (SCHÄGGER; VON JAGOW, 1987, SILVA Jr., 2001). Após o processo de secagem o gel foi digitalizado e foram feitas análises pelo programa computacional *Image Master* (GE Helthcare).

3.1.5 Quantificação proteica

A quantificação do soro hiperimune, amostra precipitada, amostra dessalinizada, das frações provenientes da cromatografia e da anti-IgG canina purificada foi determinada pelo método ácido bicinchonínico (BCA) (SMITH *et al.*, 1985). Este método monitora os íons cobre monovalentes produzidos na reação de proteínas com cobre bivalente formando um complexo colorido com BCA, o qual pode ser mensurado por técnicas colorimétricas (ZAIA *et al.*, 1998). Nesta quantificação as leituras são realizadas a 562 nm e o limite de detecção é de 0,5 mg/L. Para a realização da quantificação, a proteína BSA foi utilizada como padrão nas concentrações de 1 mg/mL, 0,5 mg/mL, 0,25 mg/mL, 0,125 mg/mL, 0,062 mg/mL, e 0,03 mg/mL. A solução tampão Fosfato de Sódio 0,01 M, pH 7,2 foi utilizada como branco e como diluente da proteína BSA.

3.1.6 Determinação do ponto isoeletrico (pI) por focalização isoeletrica em gel de poliacrilamida (IEF-PAGE)

Após a purificação, a anti-IgG canina foi submetida ao IEF-PAGE. Para este procedimento foi utilizado um *pre-cast* (pré-moldes) de gel de poliacrilamida apresentando gradiente de pH entre 3-9 (Phastsystem, GE Healthcare). Após a corrida o gel foi fixado com ácido tricloro acético (TCA) por 30 minutos a 4°C, e então revelado por 1 hora com a solução

corante de *Coomassie Blue G* 0,25% (MeOH:HAc:H₂O, 35:0,8:57 v/v/v) para gel de IEF e descorado em solução descorante Etanol; Ácido Acético; água (30:10:60 v/v/v). As raias do gel contendo as bandas eletroforéticas reveladas foram submetidas à densitometria e o pI foi estimado utilizando padrões de pI (2,5 – 10) através de análises obtidas no programa computacional *Image Master* (GE Healthcare).

3.2 PRODUÇÃO DO CONJUGADO (IgG-HRP)

As conjugações entre as imunoglobulinas purificadas com a HRP (IgG-HRP) foram preparadas segundo a técnica proposta por Nakane e Kawaoi (1974).

3.2.1 Reação de oxidação da enzima peroxidase

A fração contendo a anti-IgG canina, purificada anteriormente, foi submetida à cromatografia de peneiração e exclusão molecular em coluna cromatográfica PD-10 SephadexTM G-25 (GE Healthcare) utilizando a solução tampão Carbonato 0,016 M, Bicarbonato 0,034 M pH 9,6 para ser posteriormente conjugada à HRP.

Em uma etapa prévia à reação de conjugação, procedeu-se a reação de oxidação da HRP (Tipo VI, Sigma Aldrich) pelo metaperiodato de sódio (NaIO₄) (Sigma Aldrich), em meio aquoso. Nesta etapa, quatro alíquotas, de 6 mg cada, da HRP, foram transferidas para quatro diferentes frascos, aos quais adicionou-se 1 mL de água purificada. O metaperiodato de sódio foi pesado de modo a obter as concentrações finais de 0,05 M; 0,1 M; 0,2 M e 0,1 M deste reagente, respectivamente. Esta etapa foi realizada a fim de otimizar o processo de obtenção do conjugado. Cada frasco foi identificado como conjugado 1, 2, 3 e 4, sucessivamente. O metaperiodato de sódio foi adicionado à HRP e as misturas foram mantidas sob agitação, à temperatura ambiente, por 20 minutos. Após este tempo, as amostras foram submetidas à coluna PD-10, previamente equilibrada com solução tampão Acetato de Sódio 1 mM, pH 4,4.

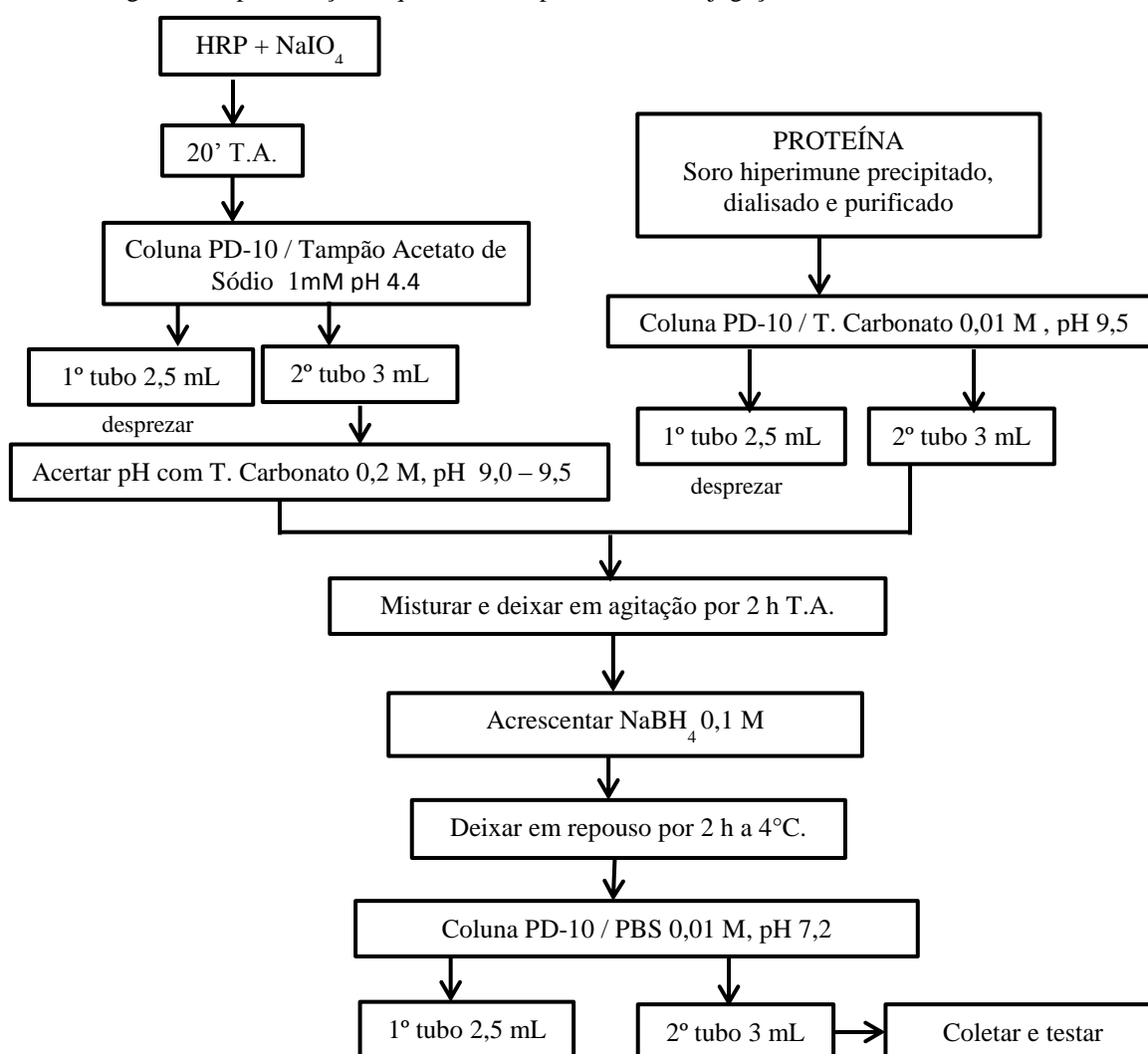
3.2.2 Reação de conjugação

Para a reação de conjugação, cada uma das soluções purificadas contendo a enzima HRP oxidada foi misturada a 1 mL de suspensão proteica, contendo 12 mg da anti-IgG canina. As misturas reacionais foram deixadas sob agitação suave, por duas horas, à temperatura ambiente. Após o tempo reacional, adicionou-se uma quantidade de borohidreto de sódio (NaBH_4) (Sigma Aldrich), de modo que a concentração final deste sal, nos conjugados 1, 2 e 3, fosse de 0,1 M e no conjugado 4 foi adicionado o correspondente a 0,2 M.

Após homogeneização, as misturas foram mantidas por mais duas horas, a 4°C. Ao término da reação, as amostras foram eluídas em colunas PD-10 equilibradas com PBS 0,01 M, pH 7,2, para troca do tampão e remoção de compostos de baixa massa molecular (Figura 8).

A concentração do conjugado (IgG-HRP) foi calculada por BCA conforme o item 3.1.5.

Figura 8. Representação esquemática do processo de conjugação.



T. = tampão, T.A. = temperatura ambiente

Fonte: POP 1831, 2010. – SEICA/DERED

3.3 PADRONIZAÇÃO DO ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO (ELISA) UTILIZANDO O ESTABILIZANTE COMERCIAL GUARDIAN™

Para padronizar o Elisa foi necessário testar diferentes diluições dos conjugados obtidos e avaliar esses resultados frente a um antígeno de Leishmaniose Visceral utilizado no diagnóstico canino, contra soros controles positivos e negativos previamente testados. O modelo empregado foi o Elisa indireto, no qual uma mistura de antígenos de citosol do parasito *Leishmania major like* foi adsorvido em microplacas de Elisa. O teste de Elisa foi realizado de acordo com o indicado pela bula do *kit* EIE - LVC. Entretanto, os conjugados

obtidos foram testados utilizando um estabilizante diferente do estabelecido na produção (SEICA) e, além disso, as microplacas de poliestireno (Microlon 600 fundo U Greiner) foram revestidas com a solução “*post-coating*” (BSA 0,5%, Sacarose 6%, Kathon CG 0,1%, Álcool Polivinílico 4% em tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,2). Após a adição da solução, o produto foi aspirado em sistema de aspiração semiautomático (com um pente multicanal acoplado à bomba de vácuo e kitasato) e as placas foram dispostas em estufa a 37°C por 1 hora para a completa secagem do produto. Posteriormente as placas foram embaladas e fechadas hermeticamente em seladora semiautomática e mantidas em temperatura de 2°C a 8°C.

Para avaliação dos conjugados quanto à melhor concentração, iniciou-se o processo de diluição dos conjugados IgG-HRP em Guardian™. Primeiramente, os conjugados foram diluídos 1:1000 em Guardian™ e em seguida, esses conjugados foram diluídos no diluente de amostras/conjugado que acompanha o *kit* de EIE-LVC nas seguintes diluições: 5, 7,5, 10, 20, 30, 40, 50 e 60 vezes. Para a padronização do Elisa buscou-se a melhor concentração a partir da análise global dos resultados, onde, é necessário obter absorbâncias nos valores próximos a 1,5 para o soro controle positivo e igual ou menor a 0,11 para o soro controle negativo (ANEXO A).

3.4 AVALIAÇÃO IMUNOLÓGICA DOS CONJUGADOS 1, 2 e 3

Após a padronização da diluição do conjugado, a eficiência do conjugado foi avaliada por Elisa frente ao mesmo antígeno de Leishmaniose visceral descrito no item 3.3 contra soros positivos e negativos pertencentes a painéis sorológicos padronizados.

O desenvolvimento do ensaio de Elisa indireto foi iniciado pela sensibilização das microplacas e adição de “*post-coating*”. Na etapa seguinte foram aplicados na microplaca o volume de 100 µL dos soros controles (positivo e negativo para leishmaniose) e soros testes diluídos na solução tampão de diluição da amostra/conjugado [0,1% de Albumina Bovina, 10% soro bovino adulto, 5% PBS-T (PBS, Tween-20 0,05%, pH 7,2), 0,02% Katon CG biocida acrescido de leite Mólico Nestlé a 2%]. Os soros controle e teste foram dispostos nas microplacas, de forma que a diluição do conjugado e a solução tampão sem soro (SS) fossem avaliados.

Após um período de incubação de 30 minutos a 37°C, procedeu-se a lavagem com PBS-T para a retirada do material não adsorvido na placa. Esta etapa foi realizada seis vezes.

Em seguida, adicionou-se nos poços da microplaca o volume de 100 μ L dos conjugados diluídos 7,5 vezes e procedeu-se a incubação por 30 minutos a 37°C. A microplaca foi lavada novamente por seis vezes, com PBS-T, para a retirada do conjugado não ligado. Em seguida, foi adicionado, a cada poço da microplaca, o volume de 100 μ L da solução contendo o substrato (H_2O_2 a 10%) e o cromógeno (TMB 1%) (Sigma Aldrich), para revelação do ensaio por 30 minutos à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Finalmente, a reação foi interrompida com a adição de 50 μ L de ácido sulfúrico (H_2SO_4) 2 M. As absorbâncias foram determinadas a 450 nm em um leitor de microplacas (Tecan/Magelan). Um esquema exemplificando a disposição de todas as amostras na placa está no ANEXO A.

Para a estimativa dos níveis de sensibilidade e especificidade dos conjugados obtidos a partir dos ensaios de Elisa, foram utilizados 20 soros caninos positivos e 20 soros caninos negativos disponíveis no LATED, os quais foram caracterizados pelos critérios parasitológico, clínico, epidemiológico e sorológico.

A sensibilidade (S) do teste é dada pela percentagem de positivos detectados pelo teste entre os indivíduos sabidamente doentes (verdadeiros positivos – VP). A especificidade (E), pela percentagem de negativos, entre indivíduos não doentes (verdadeiros negativos – VN). Um resultado falso positivo (FP) acontece quando a amostra é sabidamente negativa, porém apresentou resultado positivo no teste. Já um resultado falso negativo (FN) acontece quando a amostra é sabidamente positiva, porém apresenta-se negativa no teste. Para o cálculo do percentual de sensibilidade e especificidade, são aplicadas as seguintes fórmulas.

$$S = VP / (VP + FN)$$

$$E = VN / (FP + VN)$$

3.5 ENSAIOS DE ESTABILIDADE ACELERADA DOS CONJUGADOS

A estabilidade dos conjugados selecionados foi definida, de acordo com protocolo de determinação de estabilidade acelerada (MONTROYA; CASTELL, 1987). Para este estudo foram utilizadas três condições de termoestabilidade a 4°C, 37°C e 50°C. Os diferentes conjugados na diluição de 7,5 x foram acondicionados em geladeira a 4°C, estufa a 37°C e em banho-maria a 50°C por 45 dias. A estabilidade do conjugado foi avaliada por Elisa em intervalos irregulares de tempo conforme descrito anteriormente no item 3.4.

3.6 ANÁLISE CONFORMACIONAL DOS CONJUGADOS

3.6.1 Avaliação por cromatografia de exclusão e peneiração molecular

Para analisar as diferenças entre os conjugados, utilizamos cromatografia de exclusão e peneiração molecular. A coluna Protein Pak 300 SW (Waters) com volume total de 14,3 mL foi equilibrada com a solução tampão Fosfato de Sódio 0,01 M, pH 7,0. O volume de 100 µL dos conjugados, foi aplicado na coluna cuja faixa de fracionamento é de 10 kDa a 500 kDa. O fluxo de eluição foi de 1 mL/min e a pressão limite estabelecida foi de 10 Mpa. O perfil cromatográfico foi obtido através da detecção da absorvância em 220 e 280 nm.

Para analisar as diferenças entre as frações de um único conjugado, selecionamos o conjugado 2 e realizamos uma cromatografia utilizando a coluna Superdex 200 HR 10/30 de 24 mL de volume total (Amersham Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Suécia), equilibrada em solução tampão PBS. Para esta cromatografia o fluxo de eluição da coluna foi de 1 mL/min com a pressão limite estabelecida em 1,5 MPa. A absorvância foi detectada a 220 e 280 nm.

3.6.2 Avaliação do conjugado por dicroísmo circular (DC)

As medidas de DC foram realizadas em um espectropolarímetro Jasco J-815 (Jasco Corp., Tóquio, Japão), coletando espectros de 200 a 260 nm, com o uso de uma cubeta de quartzo de 0,2 cm de caminho óptico. Foram feitas três medidas consecutivas e o espectro final é resultado da acumulação destas três medidas, obtidas na velocidade de 50 nm/min, com subtração adequada dos espectros dos respectivos brancos acumulados da mesma forma. Os espectros foram determinados utilizando os conjugados na concentração de 1 mg/mL diluídos em PBS 0,01 M, pH 7,2.

3.6.3 Avaliação do conjugado por espectrometria de fluorescência e espalhamento de luz

Para o monitoramento das mudanças na estrutura da imunoglobulina e do complexo formado após a conjugação com HRP foram realizados experimentos de fluorescência utilizando um espectrofluorímetro JASCO FP-6500 (Jasco Corp., Tóquio, Japão) com uma lâmpada de xenônio de 300 W. Para a obtenção dos espectros de fluorescência de triptofano, as amostras foram excitadas com um comprimento de onda de 280 nm e a emissão foi varrida de 295 a 415 nm. Para as análises do espalhamento de luz, as amostras foram excitadas a 320 nm e a luz espalhada foi detectada na faixa de 300 a 340 nm e quantificada pela área correspondente aos valores de intensidade obtidos neste intervalo. As medidas de espalhamento de luz foram obtidas a 90°C.

Para realizar a desnaturação térmica, os conjugados foram submetidos a temperaturas crescentes de 25°C até 85°C, com intervalos de 5°C, permanecendo 10 minutos em cada temperatura. Para os experimentos de análise conformacional da HRP na presença e ausência de metaperiodato de sódio. A HRP a uma concentração de 1 mg foi diluída em água milli-Q e incubada em diferentes concentrações de metaperiodato de sódio (50 µM até 1000 µM), durante 20 minutos. Em seguida, os espectros de fluorescência foram realizados.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 SORO HIPERIMUNE DE CABRA ANTI-IgG CANINA

O soro hiperimune foi obtido a partir da imunização de caprinos de médio porte com IgG canina comercial conforme preconizado pelo POP 1436 (2010) da SEICA. O título do soro, após a sangria e retração do coágulo, foi determinado pelo método de imunodifusão radial simples, sendo obtida a titulação de 1:32.

4.2 DESSALINIZAÇÃO E PURIFICAÇÃO DAS IMUNOGLOBULINAS

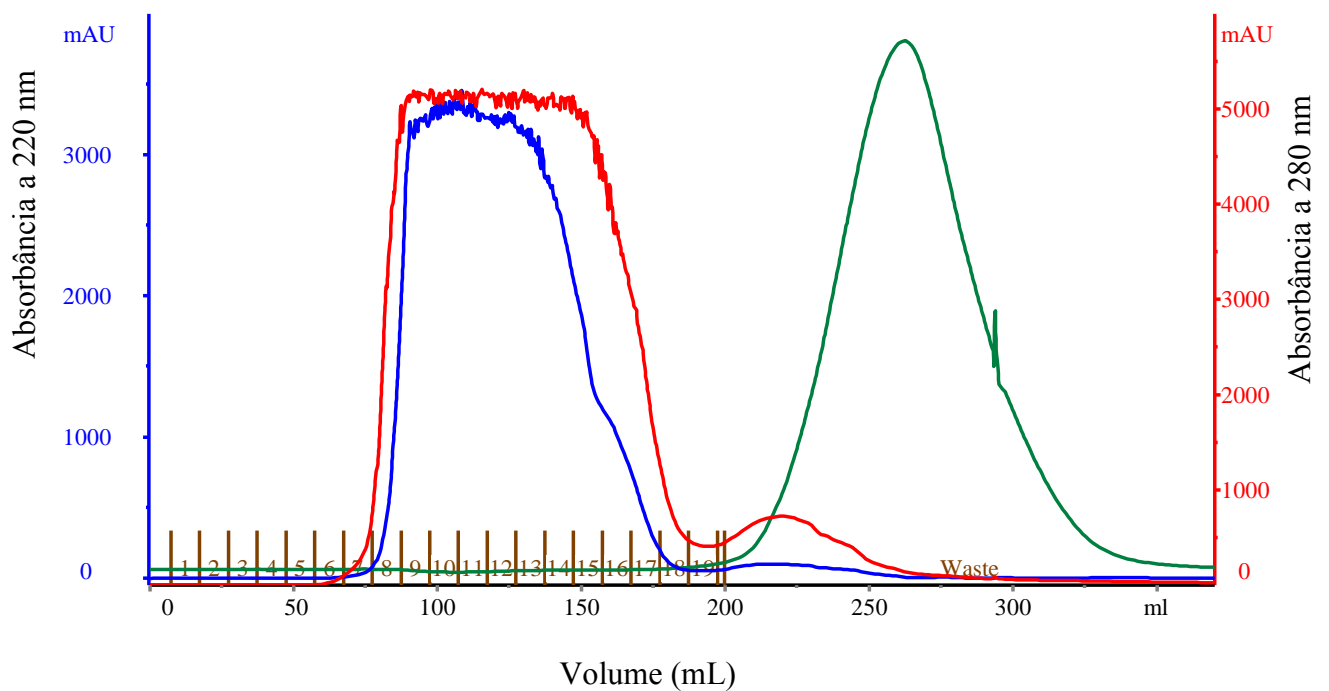
O tratamento do soro hiperimune anticão com solução a 30% de saturação de sulfato de amônio produziu um precipitado que após dissolução em água foi reprecipitado com solução a 45% de saturação de sulfato de amônio. Após a precipitação a porção solúvel foi submetida a um processo de dessalinização. Neste procedimento, a coluna de exclusão e peneiração molecular SephadexTM G-25 (GE Healthcare) foi equilibrada com a solução tampão Tris-HCl 50 mM, pH 8,0 e as frações correspondentes a zona de exclusão desta coluna (frações 9 a 20) foram recolhidas (Figura 9). Para realizar o fracionamento das proteínas e isolar a anti-IgG canina, as frações recolhidas foram cromatografadas na coluna de troca iônica (Poros HQ) conforme pode ser observado pelo perfil assinalado na Figura 9. Nesta cromatografia foi realizado um gradiente em 3 passos, sendo coletadas 10 mL de frações correspondentes ao *void*, onde a maior parte das proteínas são desprezadas sem interagir com a coluna, os picos correspondentes a 20% do gradiente (fração 6, frações 7, 8 e 9 e frações 10 e 11), e o pico correspondente a 100% do gradiente (frações 66 e 67). As frações correspondentes aos picos cromatográficos mencionados foram coletadas e analisadas por SDS-PAGE para a identificação das frações que continham a imunoglobulina purificada.

A precipitação de imunoglobulinas com sulfato de amônio ainda é a técnica mais utilizada como o passo anterior à purificação (GANGNON, 2012). Neste estudo, não houve modificação da técnica de precipitação empregada atualmente na SEICA, entretanto, após a precipitação o material foi dessalinizado contrastando com o método de diálise rotineiramente empregado. Analisando os dois métodos (dessalinização x diálise), foi observado que a

dessalinização é mais vantajosa visto que este método pode ser realizado em dois dias quando comparado a diálise que é realizada por um período de duas semanas.

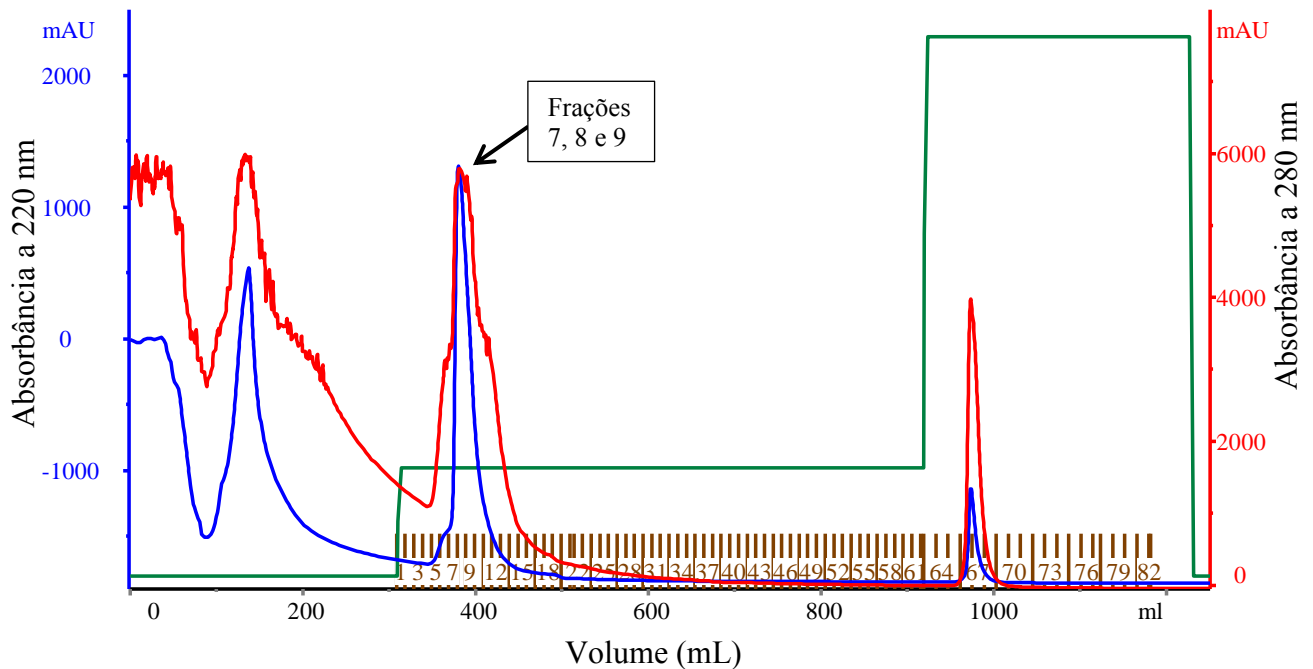
A cromatografia de troca iônica, bem como a cromatografia de afinidade vem sendo empregada para a purificação de imunoglobulinas. Entretanto, a cromatografia de troca iônica foi empregada por ser considerada extremamente seletiva, as resinas são economicamente mais favoráveis e pode ser aplicada para purificação de imunoglobulinas em um único passo ou associada a afinidade por proteína A (LIU *et al.*, 2010).

Figura 9. Dessalinização do soro hiperimune precipitado contendo anti-IgG canina por cromatografia de peneiração e exclusão molecular – A coluna XK-50 empacotada com volume total de 370 mL de resina Sephadex G-25. foi equilibrada em solução tampão Tris-HCl 50 mM, pH 8,0. A cromatografia foi realizada, com um fluxo de 10 mL/min e a absorbância foi detectada em 220 nm (azul) e 280 nm (vermelho). A condutividade foi monitorada para observar a passagem do sal pela coluna (verde).



Fonte: Gráfico gerado pelo programa computacional Unicorn 5.11 do cromatógrafo líquido de alta eficiência Äkta Purifier 100 (GE Healthcare).

Figura 10. Purificação da anti-IgG canina por cromatografia de troca iônica em coluna Poros HQ. A coluna foi equilibrada em solução tampão Fosfato de Sódio 20 mM, pH 7,0, com um fluxo de 35 mL/min e a absorbância foi detectada em 220 nm (azul) e 280 nm (vermelho). A cromatografia foi realizada utilizando um gradiente de sal até 1 M, nos seguintes passos cromatográficos: ausência de sal, 20% e 100% (verde). A seta indica as frações 7,8 e 9 referentes ao pico observado em 20% do gradiente salino que foram coletadas.



Fonte: Gráfico gerado pelo programa computacional Unicorn 5.11 do cromatógrafo líquido de alta eficiência Äkta Purifier 100 (GE Healthcare)

4.3 ANÁLISE DA IMUNOGLOBULINA POR SDS-PAGE

Com a finalidade de identificar a fração na qual a imunoglobulina foi isolada bem como estudar mais detalhadamente cada etapa do processo de obtenção desta proteína, foram avaliados os perfis eletroforéticos das frações, obtidos através da técnica de SDS-PAGE na ausência e na presença de DTT conforme indicado nas Figuras 11 e 12, respectivamente.

Na figura 12 que representa o gel na presença do redutor pode-se observar duas bandas principais com massa molecular de aproximadamente 58 kDa e 24 kDa, que representam a cadeia pesada e cadeia leve da imunoglobulina, respectivamente. Este resultado condiz com o esperado para IgG nestas condições, devido ao fato do DTT ou outro agente redutor, romper as pontes de enxofre formadas entre as diferentes cadeias da IgG (HONG *et al.*, 2008). Entretanto, o perfil eletroforético observado para imunoglobulina no SDS-PAGE na ausência

do redutor demonstra apenas uma banda com massa molecular maior que 150 kDa o que também é corroborado pelos dados da literatura, conforme Figura 11 (HONG *et al.*, 2008).

A análise de ambos os géis na presença e ausência de redutor indica que a imunoglobulina está presente nas raias 2 (soro hiperimune), 3 (soro precipitado), 4 (soro dessalinizado, 5 (void) e 7 (frações 7 a 9) do SDS-PAGE, representando todas as etapas do processo de obtenção da imunoglobulina. Além disso, pode-se observar que a imunoglobulina foi isolada com homogeneidade satisfatória nas frações 7, 8 e 9 (raia 7) referentes ao pico cromatográfico coletado da troca iônica em 20% de sal (Figuras 11 A e 12 A).

Através da análise densitométrica dos géis de SDS-PAGE pode-se detectar sete das oito proteínas do padrão de massa molecular *Prestained® Broad Range*, as quais geraram uma curva de calibração de massa molecular com coeficiente de correlação R^2 0,9900 e R^2 0,9844, referentes às corridas na ausência e presença de DTT (Figuras 11 B e 12 B). Para ambos os géis a curva de calibração de massa molecular apresentou um valor aceitável de R^2 , com todos os pontos se ajustando na curva log de PM x posição no gel. As áreas das bandas, a mobilidade eletroforética relativa (Rf) e MM da imunoglobulina presente nas raias 2, 3, 4, 5 e 7 dos géis, foram determinadas conforme os dados demonstrados na Tabela 1 e nas Figuras 11 C e D, 12 C e D.

A análise do gel na ausência de DTT nos indica que a imunoglobulina apresenta valor de mobilidade eletroforética em torno de 0,1 em todas as etapas de isolamento e área de banda eletroforética variando entre 50 a 100% (Figura 11, Tabela 1). A análise do gel na presença de DTT nos indica que a imunoglobulina apresenta em todas as etapas de isolamento, valor de mobilidade eletroforética em torno de 0,2 para cadeia pesada e 0,5 para cadeia leve. A porcentagem da área da banda apresentou variações ao longo do processo de obtenção da imunoglobulina com valores em torno de 78% para cadeia pesada e 22% para cadeia leve na raia 7 (Figura 11, Tabela 1).

Figura 11. Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio 7,5% na ausência de DTT. (A) Raia 1 – Padrões de massa molecular *Prestained® Broad Range* (Bio-Rad Laboratories), raia 2 - Soro hiperimune antes da precipitação, raia 3 - Soro precipitado, raia 4 - Amostra dessalinizada, raia 5 a 9 – Frações oriundas da cromatografia de troca iônica (raia 5 – *Void*, raia 6 - Fração 6 (20%) do gradiente, raia 7 - Frações 7, 8 e 9 (20%) do gradiente, raia 8 - Frações 10 e 11 (20%) do gradiente e raia 9 - Frações 66, 67 (100%) do gradiente). (B) Curva de calibração de massa molecular por SDS-PAGE 7,5%, produzida pelo programa *Image Master*. (C) Densitometria das bandas eletroforéticas da SDS-PAGE 7,5% do padrão de massa molecular e (D) das frações reunidas 7, 8 e 9 contendo a imunoglobulina purificada.

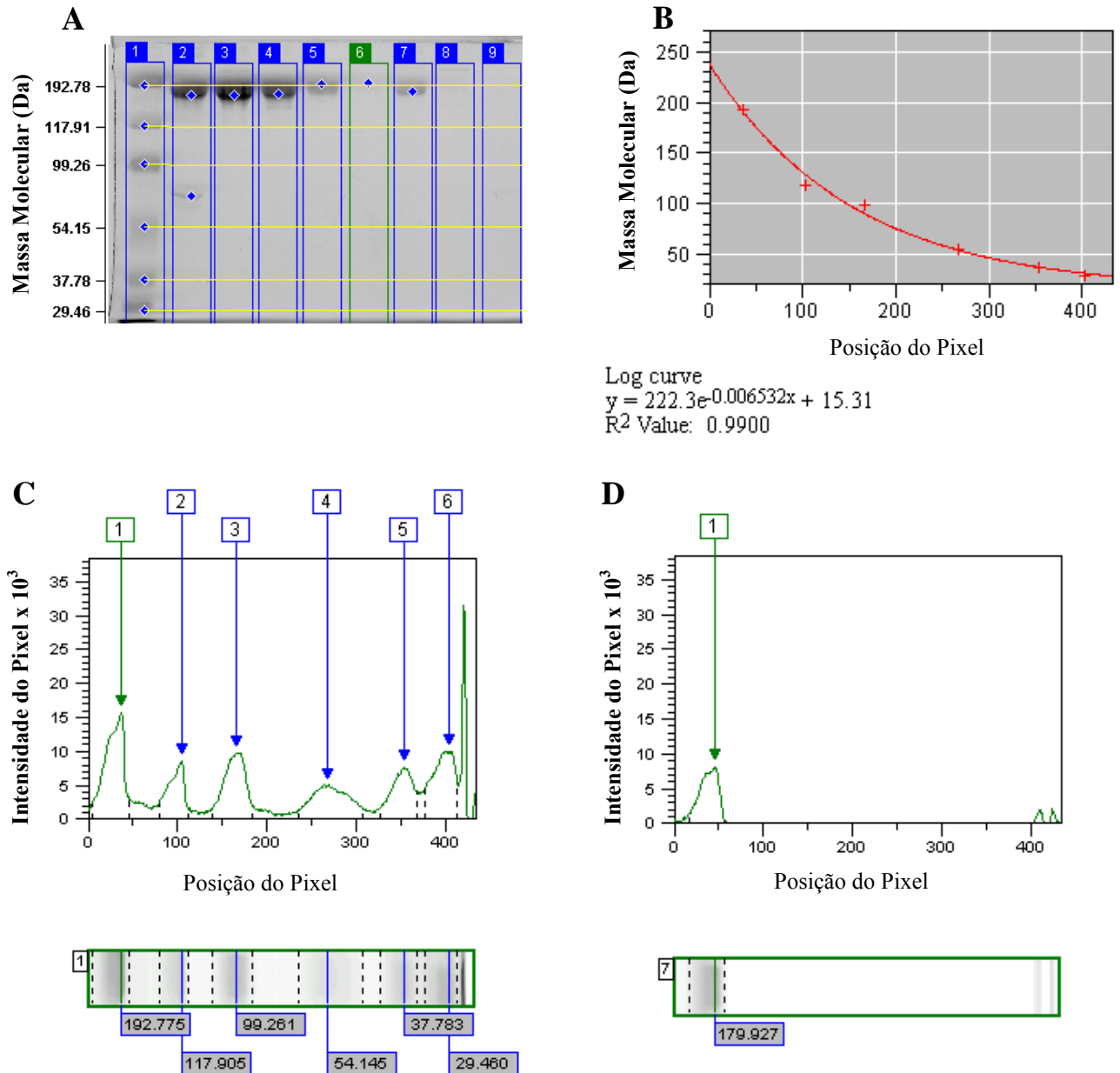


Tabela 1.

Valores de mobilidade eletroforética (Rf), massa molecular (MM) e área das bandas eletroforéticas das etapas do processo de purificação do soro hiperimune para obtenção da IgG, observadas na SDS-PAGE 7,5% e gerados pelo programa *ImageMaster*®.

SDS-PAGE sem DTT	Banda	Área	Banda %	MM (kDa)	Rf
raia 2	1	3.782,00	90,62	173,6	0,12
	2	3.038,00	9,38	69,184	0,501
raia 3	1	1.922,00	100	182,092	0,102
raia 4	1	2.480,00	100	174,637	0,118
raia 5	1	2.790,00	100	192,19	0,081
raia 7	1	2.480,00	100	179,927	0,106

MM = massa molecular; Rf = mobilidade eletroforética; SDS = sódio dodecil sulfato; PAGE = eletroforese em gel de poliacrilamida; DTT = dititritol

Figura 12. Eletroforese em gel de poliacrilamida 12% com dodecil sulfato de sódio na presença de DTT. (A) Raia 1 – Padrões de massa molecular *Prestained® Broad Range* (Bio-Rad Laboratories), raia 2 - Soro hiperimune antes da precipitação, raia 3 - Soro precipitado, raia 4 - Amostra dessalinizada, raia 5 a 9 – Frações oriundas da cromatografia de troca iônica (raia 5 – Void, raia 6 - Fração 6 (20%) do gradiente, raia 7 - Frações 7, 8 e 9 (20%) do gradiente, raia 8 - Frações 10 e 11 (20%) do gradiente e raia 9 - Frações 66 e 67 (100%) do gradiente). (B) Curva de calibração de massa molecular da SDS-PAGE 12%, produzida pelo programa Image Master. (C) Densitometria das bandas eletroforéticas do SDS-PAGE 12% do padrão de massa molecular e (D) das frações reunidas 7, 8 e 9 contendo a imunoglobulina purificada.

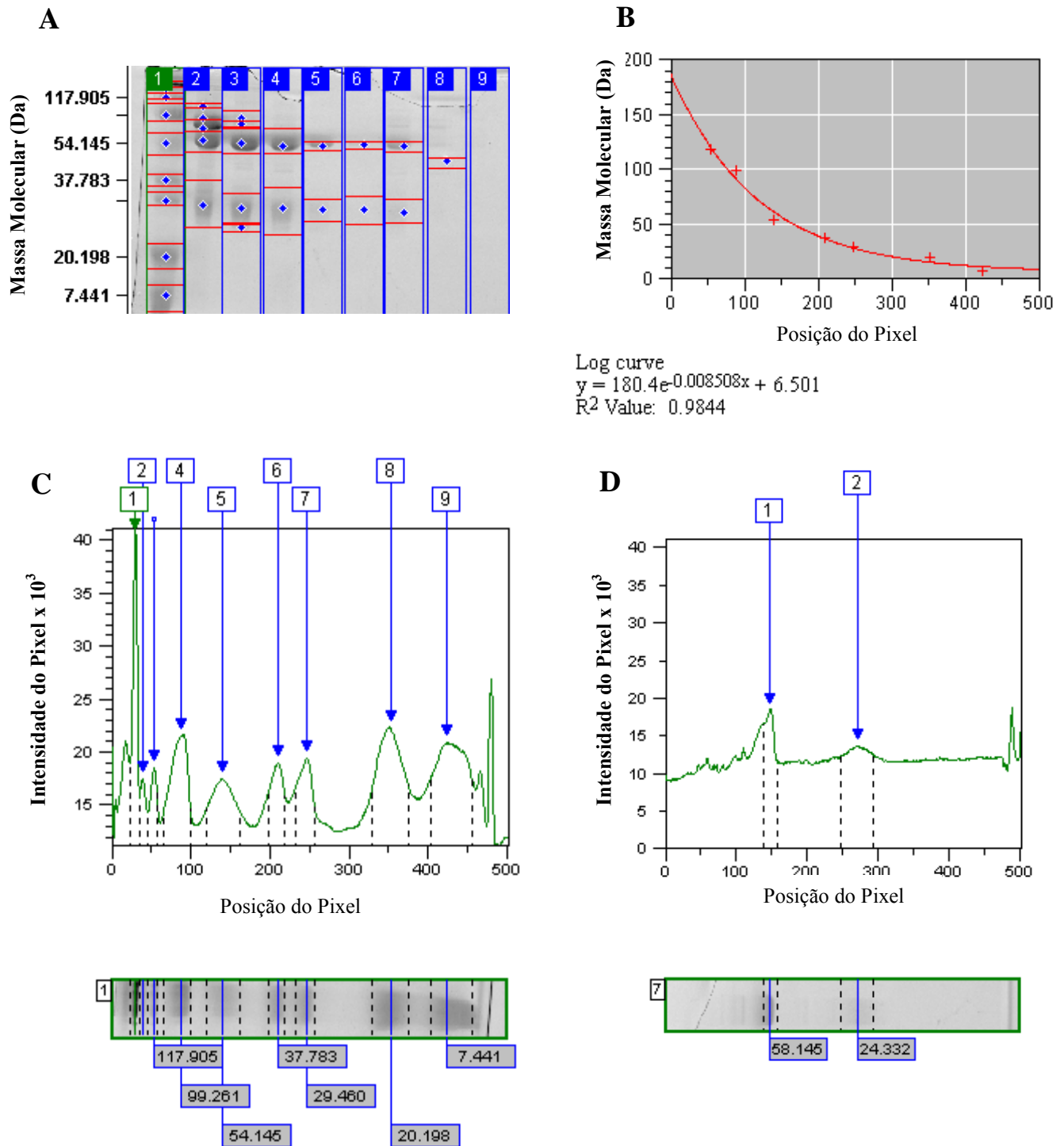


Tabela 2.

Valores de mobilidade eletroforética (Rf), massa molecular (MM) e área das bandas eletroforéticas das etapas do processo de purificação do soro hiperimune para obtenção da IgG, observadas na SDS-PAGE 12% e gerados pelo programa ImageMaster®.

SDS-PAGE com DTT	Banda	Área	Banda %	MM (kDa)	Rf
raia 2	1	720	1	102,606	0,148
	2	1.512,00	9,74	87,569	0,188
	3	1.728,00	37,05	75,469	0,226
	4	2.736,00	42,46	62,731	0,273
	5	6.408,00	9,74	26,587	0,515
raia 3	1	3.384,00	63,59	52,266	0,283
	2	4.752,00	36,41	23,575	0,529
raia 4	1	3.384,00	79,52	58,145	0,293
	2	6.192,00	20,48	25,751	0,525
raia 5	1	1.224,00	95,82	58,145	0,293
	2	6.192,00	20,48	25,751	0,525
raia 7	1	1.008,00	77,56	59,48	0,287
	2	3.744,00	22,44	25,266	0,531

MM = massa molecular; Rf = mobilidade eletroforética; SDS = dodecil sulfato de sódio; PAGE = eletroforese em gel de poliacrilamida; DTT = ditioneitol

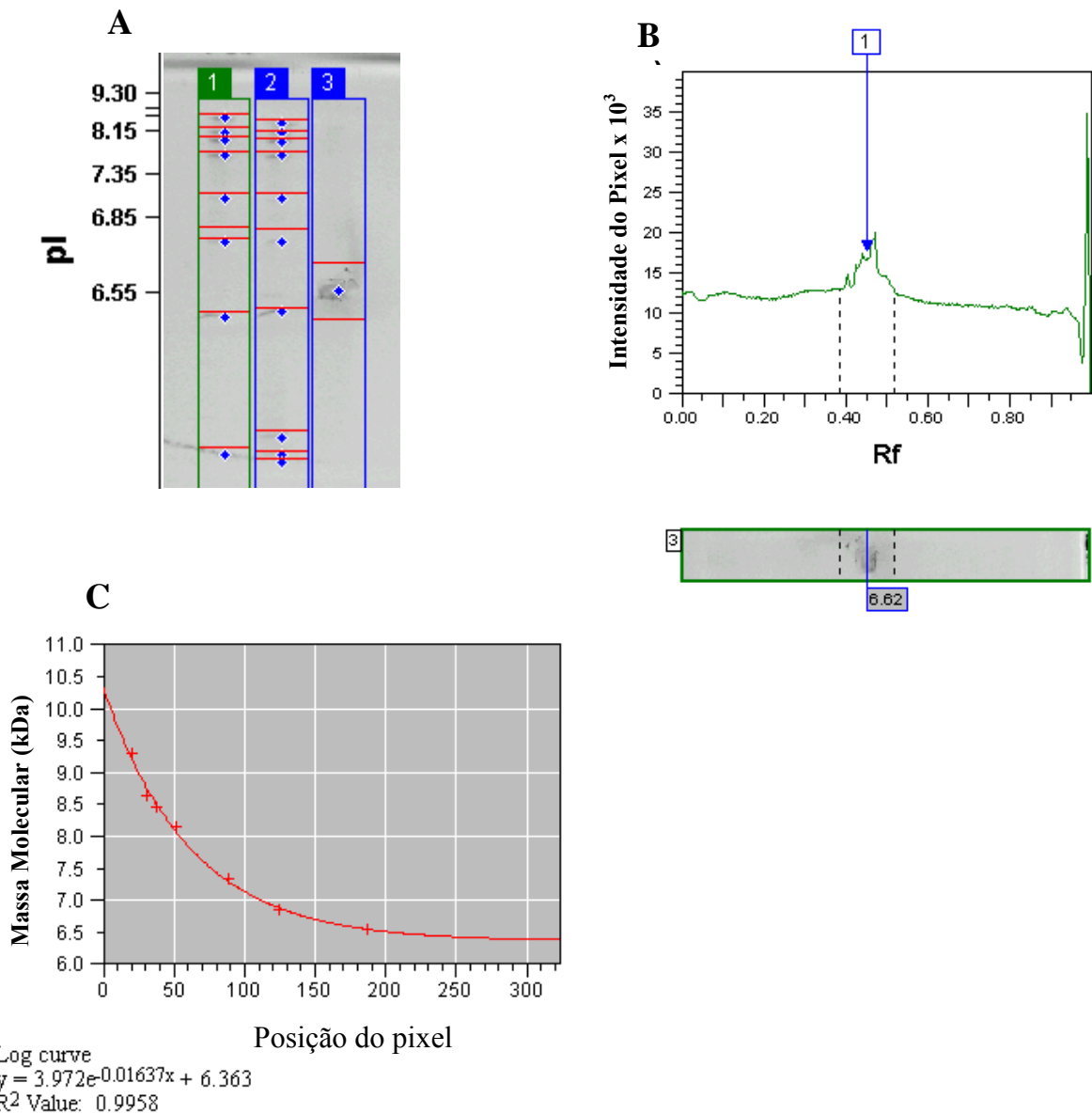
4.4 DETERMINAÇÃO DO pI POR FOCALIZAÇÃO ISOELÉTRICA EM GEL DE POLIACRILAMIDA

Para a obtenção do valor de pI da imunoglobulina através da focalização isoeletrica foi necessário comparar o valor obtido com padrões proteicos de pIs conhecidos (raias 1, 2 e 3). A lista de proteínas e seus respectivos pIs do padrão ácido-básico (pI 3 a 10) está descrita na Figura 13. Foram observadas 9 bandas dos padrões proteicos de pI 3 a 10 da GE Healthcare, cuja curva de calibração apresentou R^2 igual a 0,9958.

A análise da focalização isoeletrica em gel de poliacrilamida a 7,5% usando-se um gradiente de pH de 3-9, indicou que a fração contendo a IgG purificada apresenta pI de 6,62, quando analisada pelo programa *Image Master* (Figura 13). Esses dados são corroborados por relatos da literatura que indicam que a IgG pode apresentar pI em torno de 6,5-9,5 (CHIODI

et al., 2005). A variação de pI é esperada para IgG, pois estas podem apresentar isoformas (SCHROEDER; CAVACINI, 2010).

Figura 13. Focalização isoeétrica em gel de poliacrilamida pH 3-9 para estimativa do pI da imunoglobulina purificada, analisada pelo programa *Image Master*. (A) Eletroferograma e análise densitométrica da focalização isoeétrica em gel de poliacrilamida. Raias 1 e 2 - padrão de massa molecular em duplicata, raia 3 - Frações reunidas 7, 8 e 9 contendo a imunoglobulina purificada. (B) Densitometria das frações reunidas 7, 8 e 9. O pI foi estimado através da curva de padrões de pI - curva de calibração para determinação de pI feita a partir da corrida eletroforética de padrões de proteínas de pI conhecidos em gel de poliacrilamida. Padrão *Broad* de pI de proteínas (GE Healthcare) raias 1 e 2: Amiloglicosidase – 3,5; Vermelho de metila (corante não proteico) – 3,75; Inibidor de tipinina – 4,55; β -lactoglobulina A – 5,20; Anidrase Carbônica bovina – 5,85; Anidrase carbônica humana – 6,55; Mioglobina de cavalo – 7,35; Lectinas – 8,15; 8,45 e 8,65 e Tripsinogênio – 9,30 (C)



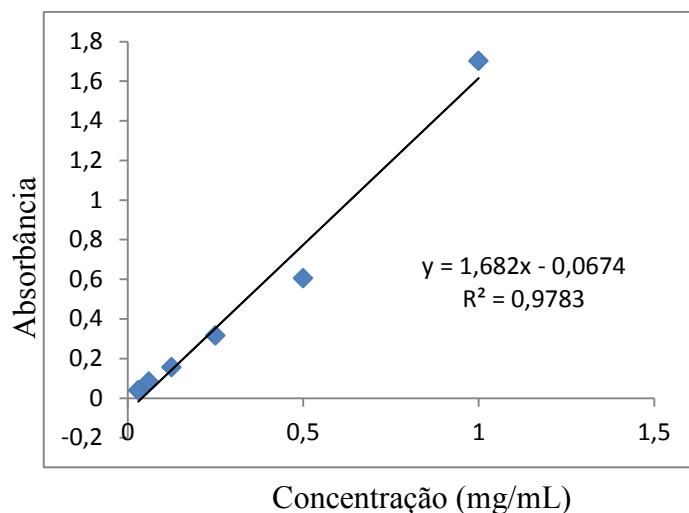
4.5 QUANTIFICAÇÃO DA IMUNOGLOBULINA PELO MÉTODO DE BCA

A dosagem espectrofotométrica referente ao método BCA foi realizada englobando as alíquotas de cada etapa do processo, desde o soro hiperimune anti-IgG canina obtido até as frações que apresentaram algum pico cromatográfico no processo de purificação (Tabela 3). De posse dos valores de absorvância da amostra, estes foram comparados à curva de padrão de BSA. O resultado referente à correlação linear entre a concentração de proteína padrão e a absorvância apresentou um valor próximo de 1 ($R^2 = 0,978$), conforme Figura 14. A concentração final estimada para a IgG purificada foi de 9,6 mg/ mL (Tabela 3).

Tabela 3.
Concentração proteica em todas as etapas do processo de obtenção da IgG através da quantificação pelo método BCA.

Amostra	Concentração mg/mL	Volume - mL
Soro hiperimune anticão	87,3	1000
Soro anticão precipitado	72,2	1000
Soro anticão dessalinizado	26,5	300
Void da troca iônica	10	50
Fração 6	0,8	5
Frações 7, 8, 9	9,6	15
Frações 10, 11	3,6	10
Frações 66, 67	0,68	10

Figura 14. Curva Padrão de BSA, equação da reta e o coeficiente de concentração linear para quantificação da IgG em todas as etapas do processo purificativo.



4.6 OBTENÇÃO DOS CONJUGADOS QUANTO À CONCENTRAÇÃO DE METAPERIODATO DE SÓDIO E BOROHI-DRETO DE SÓDIO

Para avaliar a estabilidade dos conjugados, foram obtidos conjugados com 3 diferentes concentrações de metaperiodato de sódio e 2 concentrações diferentes de borohidreto de sódio (Tabela 4). Vale ressaltar que o conjugado 2 foi produzido utilizando as mesmas condições que o conjugado produzido atualmente na SEICA. Após a conjugação os conjugados foram purificados por SEC, que é um método muito rápido e eficaz para purificação de conjugados (HERMANSON, 2008). Em seguida, a concentração destes foi determinada pelo método de BCA, de acordo com o item 3.1.5 (Tabela 4). A quantificação proteica dos complexos IgG-HRP foi determinada frente a uma curva padrão na qual a correlação linear entre a concentração de proteína padrão e a absorbância apresentou um valor próximo de 1 ($R^2 = 0,99$). Esta metodologia foi utilizada anteriormente para quantificação de diversos tipos de conjugados (DHAWAN, 2002, SIMONS *et al.*, 2006)

Para todos os conjugados, após a adição do metaperiodato de sódio durante o processo de conjugação, foi possível visualizar a formação de espuma, entretanto, o conjugado 4 apresentou uma quantidade de espuma superior aos demais, o que dificultou a sua eluição com solução tampão PBS, em coluna PD-10 (GE Healthcare), tornando o seu volume e

concentração inferior aos demais conjugados (Tabela 4). Após esta constatação, o conjugado 4 não foi incluído nos testes de estabilidade acelerada por Elisa.

Novas estratégias e otimização de técnicas para conjugar imunoglobulinas a uma série de enzimas ou marcadores vem sendo descritas na literatura. Estas estratégias visam à amplificação de sinal obtida pelo reconhecimento antígeno-anticorpo (YOSHITAKE *et al.*, 1982, TSANG *et al.*, 1995, DHAWAN, 2002, SIMONS *et al.*, 2006). Em 1995, Tsang *et al.* realizaram otimizações no processo de conjugação à HRP obtendo um conjugado 25 vezes mais sensível que conjugados comerciais (TSANG *et al.*, 1995).

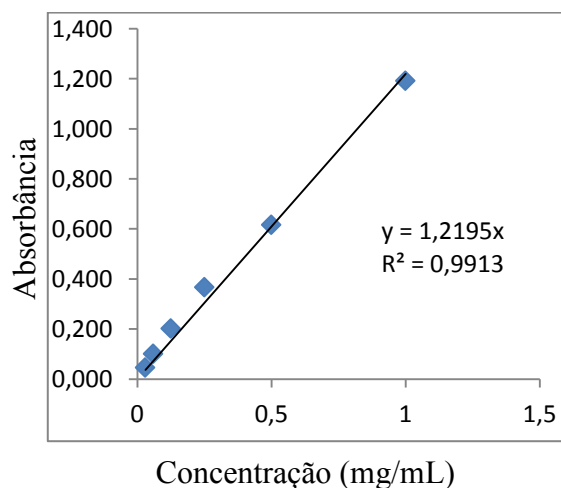
Nesta dissertação, as alterações realizadas no processo de conjugação variando os reagentes metaperiodato de sódio e borohidreto de sódio visavam estudar se haveria a formação de conjugados mais homogêneos e se estes seriam mais eficientes e estáveis.

Tabela 4.

Relação Molar (HRP/IgG) dos conjugados obtidos utilizando três concentrações diferentes de NaIO_4 e duas concentrações diferentes de NaBH_4 . Quantificação de proteínas totais presentes nos conjugados pelo método de BCA.

	IgG/HRP mg/mL – mg/mL	NaIO_4	NaBH_4	Dosagem de proteína mg/mL
Conjugado 1	12 / 6	0,0128 g (0,05 M)	0,015 g (0,1 M)	5,74
Conjugado 2	12 / 6	0,0257 g (0,1 M)	0,015 g (0,1 M)	5,66
Conjugado 3	12 / 6	0,0514 g (0,2 M)	0,015 g (0,1 M)	5,95
Conjugado 4	12 / 6	0,0257 g (0,1 M)	0,026 g (0,2 M)	2,88

Figura 15. Curva de calibração do método de BCA feita a partir das soluções de BSA padrão



4.7 ANÁLISE DO PERFIL CROMATOGRÁFICO DOS CONJUGADOS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE EXCLUSÃO E PENEIRAÇÃO MOLECULAR

A cromatografia de exclusão e peneiração molecular, também chamada de filtração molecular e em alguns casos de permeação em gel é um tipo de cromatografia líquida onde os solutos são separados em função do binômio forma-massa molecular (SILVA Jr, 2004). Esta cromatografia pode ser utilizada para o fracionamento de proteínas bem como para analisar o perfil cromatográfico de proteínas ou complexos proteicos (JANSON, 2011).

Para realizar uma cromatografia analítica dos conjugados foi utilizada a coluna Protein Pak 300SW, pois esta permite a separação de moléculas entre 10 e 500 kDa de massa molecular (WATERS CORPORATION, 2009).

Primeiramente, foi realizada a comparação do perfil cromatográfico do conjugado 2, com o perfil da imunoglobulina padrão (Rockland antibodies & assays) e da HRP (Figura 16 A). Conforme o esperado o conjugado é o primeiro a ser eluído apresentando dois picos cromatográficos com volume de retenção (VR) de 5,13 e 6,29, respectivamente, seguidos da imunoglobulina (VR=7,50) e por último a HRP (VR=9,03), conforme Figura 16 A.

Após a obtenção dos valores de massa molecular do conjugado, imunoglobulina e peroxidase obtidos a partir da curva de calibração da coluna (ANEXO B), pode-se verificar para o conjugado que o primeiro e o segundo picos apresentam massas moleculares de 1039,68 e 283,34 kDa, respectivamente. A massa molecular encontrada para o pico 1 está fora da faixa de separação de massa molecular da coluna e a massa molecular encontrada para o pico 2 é próxima a MM da Ficoeritrina. A imunoglobulina e a HRP apresentam massa molecular de 150 kDa e 44 kDa, respectivamente. A massa molecular da IgG é compatível com o padrão Aldolase (MM =158 kDa) e a massa molecular da HRP se manteve entre os padrões Conalbumina (MM = 75 kDa) e Anidrase Carbônica (MM = 29 kDa), demonstrados na Tabela 5. A curva de calibração foi realizada com os padrões assinalados na Tabela 5.

Em relação aos cromatogramas dos conjugados 1, 2, 3 e 4 foi observado que todos os conjugados apresentavam perfis cromatográficos semelhantes, somando um total de 2 a 3 picos, sendo 2 picos principais, e que a razão entre as áreas dos picos era similar para todos os conjugados (Figura 16 B e Tabela 6). De posse desses resultados, é possível sugerir que o pico referente ao conjugado 1, que apresenta volume de retenção em torno de 5,1 mL, possui área cromatográfica entre 57 a 77% e massa molecular de 1039,68 kDa. Esse conjugado pode representar um “macroconjugado” com mais de uma HRP ligada a uma ou mais

imunoglobulinas. O segundo pico que apresenta volume de retenção em torno de 6,8 mL, 19 a 40% de área de pico cromatográfico, e massa molecular de 283,34 kDa pode representar um conjugado com a razão de IgG-HRP (1:2). De acordo com a análise dos cromatogramas dos conjugados, o terceiro pico existente nos cromatogramas dos conjugados 1, 2, 4 apresentaram volume de retenção de cerca de 9 mL e 3,5 e 5,5% de área. Comparando os cromatogramas dos conjugados com o cromatograma realizado apenas com a HRP (Figura 16 A), verificamos que o terceiro pico existente nos cromatogramas do conjugado representam uma pequena quantidade de peroxidase livre de no máximo 0,004 mg/mL (Figura 16 A e Tabela 6). Em todos os cromatogramas, não foi possível observar imunoglobulina livre, sugerindo que a maior parte da imunoglobulina contida na reação de conjugação foi consumida.

Nossos dados indicam que nenhuma das concentrações de metaperiodato de sódio ou borohidreto de sódio impediu a formação de macroconjugados. Sugerimos que para obter uma produção homogênea de conjugados seria necessário investigar a relação de concentração de imunoglobulina e HRP e padronizar a conjugação em diferentes tempos de reação.

Análises do perfil cromatográfico de conjugados como estas obtidas nesta dissertação, foram realizadas também por Bieniarz *et al.* (1998) e Simons *et al.* (2006) nas quais conjugados de IgG-HRP ou IgG-AP (imunoglobulina do tipo G-fosfatase alcalina) são eluídos anteriormente a imunoglobulina apresentando valores elevados de massa molecular (BIENIARZ *et al.*, 1998, SIMONS *et al.*, 2006).

Tabela 5.
Padrões de Massa molecular utilizados na curva de calibração da Protein Pak

Proteínas	MM/kDa
Tireoglobulina	669,0
Ferritina	440,0
Ficoeritrina	240,0
Aldolase	158,0
Conalbumina	75,0
Anidrase Carbônica	29,0
Ribonuclease	13,7
Aprotinina	6,5

Figura 16. Análise dos Conjugados pelo método de exclusão e peneiração molecular. (A) Análise dos perfis cromatográficos do conjugado 2, imunoglobulina e peroxidase. As amostras estavam na concentração de 1 mg/mL. (B) Análise dos perfis cromatográficos dos conjugados 1, 2, 3, 4. A coluna protein pak foi equilibrada em Tampão PBS 0,01 M, pH 7,2, com um fluxo de 1 mL/min, pressão máxima de 1.5 Mpa e a absorbância foi detectada em 220 nm (Figura A). Foi injetado o volume de 0,1 mL para todas as amostras. A curva de calibração foi realizada através da injeção de 0,010 mL dos padrões na concentração de 5 mg cada (ANEXO B)

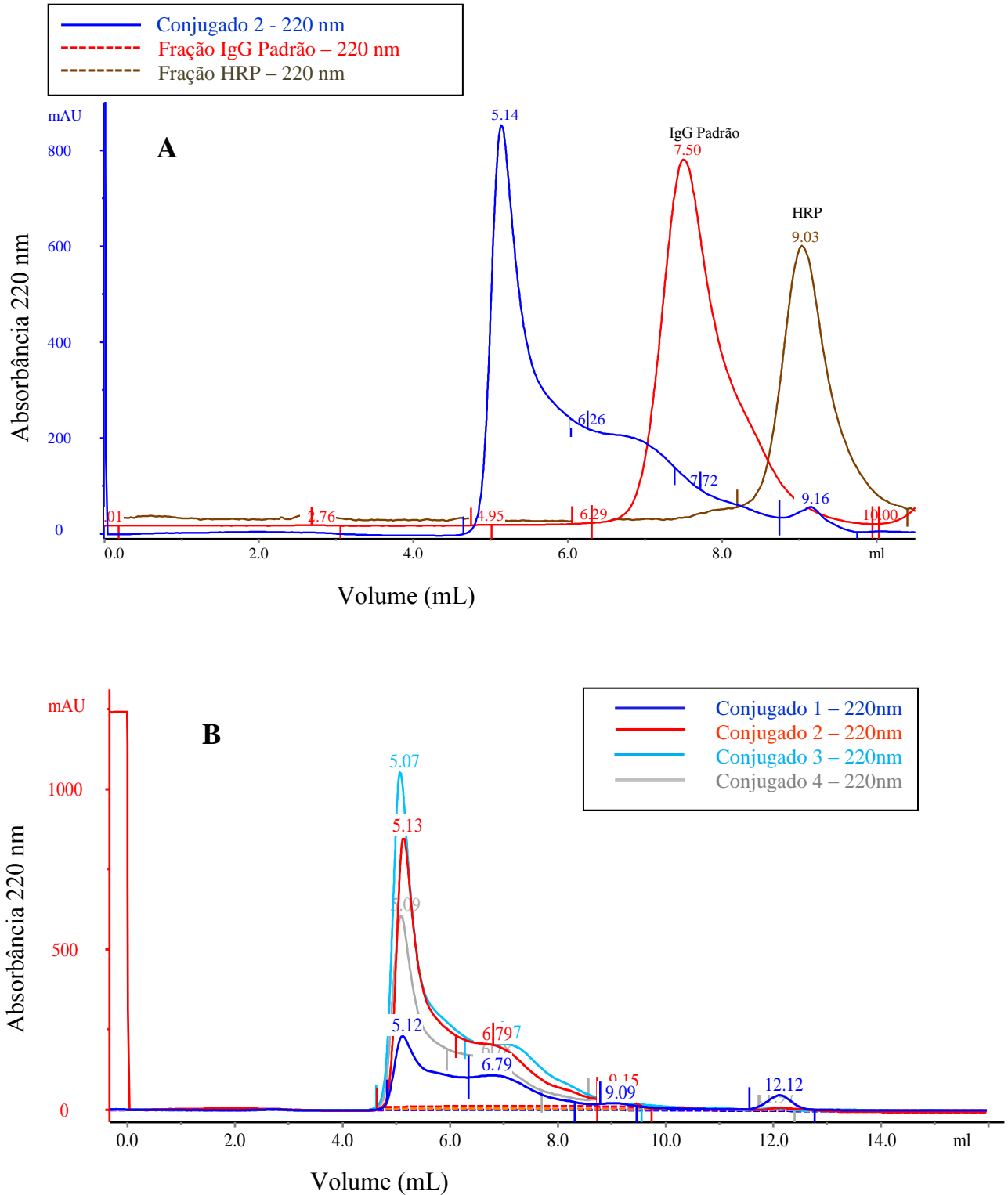


Tabela 6.

Valores de volumes de retenção, área, % de área, massa molecular e concentração da HRP após análise cromatográfica dos quatro conjugados.

		Volume de retenção (mL)	Área (mAU*mL)	% Área	Massa molecular (kDa)	Concentração (mg/mL)
Conjugado 1	pico 1	5,12	1.953.686	56,9	1047,842368	-
	pico 2	6,79	1.361.072	39,7	284,32	-
	HRP Livre	9,09	117.264	3,4	47,1	-
	Área total	-	3.432.022	-	-	-
Conjugado 2	pico 1	5,13	5.231.638	69,0	1039,685488	-
	pico 2	6,79	2.024.371	26,7	283,34	-
	HRP Livre	9,15	327.351	4,3	44,91	0,004
	Área total	-	7.256.009	-	-	-
Conjugado 3	pico 1	5,07	6.683.878	76,5	1089,596792	-
	pico 2	6,97	2.048.554	23,5	247,09	-
	HRP Livre	-	-	-	-	-
	Área total	-	8.732.432	-	-	-
Conjugado 4	pico 1	5,09	3.763.803	75,5	1072,698989	-
	pico 2	6,78	953.108	19,1	285,92	-
	HRP Livre	8,97	268.103	5,4	51,63	-
	Área total	-	4.985.014	-	-	-

4.8 ANÁLISE CONFORMACIONAL DOS CONJUGADOS

Para avaliarmos as mudanças conformacionais na estrutura terciária e secundária dos complexos formados após conjugação com HRP, realizamos experimentos de fluorescência e experimentos de dicroísmo circular. Essas técnicas têm sido utilizadas para estudar conjugados de proteínas a polissacarídeos ou a polietileno glicol (PEG) (PERCIANI *et al.*, 2013, HUANG *et al.*, 2013)

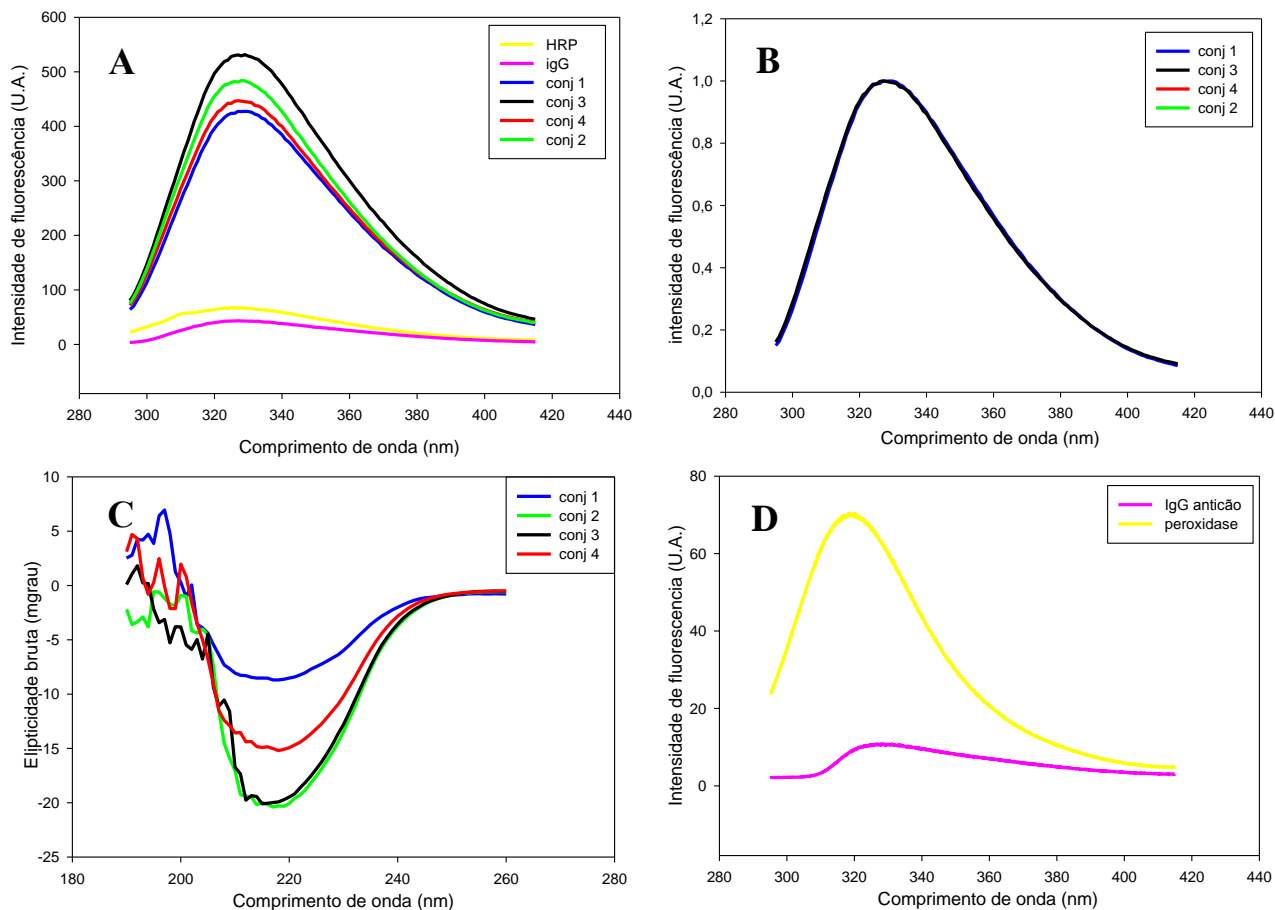
As análises das modificações estruturais foram baseadas na fluorescência intrínseca dos resíduos de triptofano e tirosina presentes na imunoglobulina (Trp=11 e Tyr=17) e HRP (Trp=1 e Tyr=4), respectivamente. Foram feitas análises utilizando as concentrações finais de cada conjugado, obtidas após a conjugação conforme Tabela 4 e por este motivo observou-se pequenas diferenças de área espectral de intensidade de fluorescência. Entretanto, ao realizar a normalização dos espectros de intensidade de fluorescência foi observado que os

conjugados apresentam perfis semelhantes, ou seja, esses resultados sugerem que embora existam diferenças na produção dos conjugados, os tratamentos variados não alteram a conformação do conjugado. Os espectros dos conjugados também diferem dos espectros da imunoglobulina e HRP conforme demonstrado na Figura 17 A e D.

A análise da estrutura secundária dos conjugados foi obtida através de variações na elipticidade dos espectros de DC. Os espectros de DC indicaram que todos os conjugados exibem estrutura predominante em folhas β , apresentando o pico de elipticidade a 217 nm. Espectros com estas características são descritos para imunoglobulinas G (SAHIN *et al.*, 2002; TETIN *et al.*, 1992), sugerindo que a maior parte do sinal do conjugado é relativo a imunoglobulina sobrepondo o sinal da HRP. Do mesmo modo o sinal de fluorescência do conjugado é na sua maior parte devido à imunoglobulina que apresenta maior quantidade de triptofanos em relação à HRP, além disso, o sinal do triptofano da HRP é fraco visto que parte da energia de excitação é transferida para o heme durante a fluorescência (MAEDA *et al.*, 2001, DUMOULIN *et al.*, 2001).

Os espectros de DC indicam que o conjugado 1 e 4 possuem menor conteúdo de estrutura secundária em comparação aos conjugados 2 e 3 que apresentaram conteúdo de estrutura secundária semelhante. É interessante observar que os conjugados 2 e 3 que tem proporções de áreas dos picos cromatográficos semelhantes, apresentam mesmo conteúdo de estrutura secundária, contrastando com o conjugado 1 que apresenta menor conteúdo de estrutura secundária e menor porcentagem de área do pico 1 quando comparado ao conjugado 2 ou 3 (Figura 17 C, Tabela 6). Esses dados sugerem que o aumento de elipticidade observado para o conjugado 2 e 3 pode ser derivado da maior quantidade de macroconjugado presente nestas amostras. O menor conteúdo de estrutura secundária do conjugado 4 pode ser explicado pelo fato deste possuir menor concentração que os demais (Figura 17 C).

Figura 17. Análise conformacional dos conjugados por fluorescência e diroísmo circular. (A) Espectros de emissão de fluorescência bruta – conjugados 1, 2, 3 e 4 – 1mg/mL. (B) Espectros de emissão de fluorescência normalizada (C) espectros de diroísmo circular. Espectros da HRP em pH 7,2 (amarelo); da IgG (rosa); do conjugado 1 (azul), do conjugado 2 (verde), do conjugado 3 (preta), do conjugado 4 (vermelha). (D) Espectros de fluorescência da HRP (amarela) e da IgG 4mg/mL (rosa). Todas as medidas foram realizadas a 25°C.



4.9 DESNATURAÇÃO FÍSICA DOS CONJUGADOS POR TEMPERATURA

A temperatura é uma variável física que pode induzir rupturas de interações fracas em proteínas, tais como van der Waals e ligações de hidrogênio, através do aumento da agitação molecular (FOGUEL *et al.*, 1998). Por esta razão, investigamos o comportamento dos conjugados frente a este agente físico e os comparamos entre si. Submetemos os conjugados na concentração de 1 mg/mL a temperaturas crescentes de 25°C a 85°C e analisamos as mudanças conformacionais através da fluorescência intrínseca e do espalhamento de luz. As áreas espectrais, bem como os valores de centro de massa, foram obtidos para cada ponto e foram construídas curvas que permitem verificar o efeito da temperatura nos conjugados (Figura 18). Os conjugados apresentaram valores de área espectral e de centro de massa

semelhantes durante as curvas de desnaturação térmica (Figura 18 A e B). Apenas o conjugado 3 apresentou um aumento da área espectral a partir de 65°C quando comparado aos demais conjugados (Figura 18 B). Essa diferença observada para o conjugado 3 também pode ser visualizada através dos dados de espalhamento de luz, onde a partir de temperatura de 65°C, ocorre um aumento dos valores de espalhamento de luz quando comparados aos demais conjugados (Figura 18 C). Os maiores valores de EL obtidos para o conjugado 3 podem ser derivados da maior porcentagem de macroconjugados conforme observado na figura 16. Os conjugados 1 e 2 apresentaram valores semelhantes de espalhamento de luz, enquanto que o conjugado 4 apresentou menores valores de espalhamento de luz quando comparado aos demais (Figura 18 C).

Para investigar se os conjugados seriam capazes de retornar à sua conformação inicial após a desnaturação térmica, realizamos um espectro de intensidade de fluorescência e de espalhamento de luz a 25°C (retorno). Ao analisarmos os espectros de retorno de todos os conjugados, observamos que os valores de centro de massa se mantêm próximos ao valor de centro de massa final obtido após a desnaturação. Em relação à área espectral, pode-se observar que os conjugados 1 e 3 retornam a valores de área inicial enquanto que os conjugados 2 e 4 não retornam a valores de área inicial. Foi observado que o conjugado 2 e 4 ao retornar a 25°C apresentam valores de área espectral semelhante ao obtido a temperatura aproximada de 45°C e de 35°C, respectivamente. A análise dos dados de espalhamento de luz ao retornar à temperatura ambiente indicam que o conjugado 1 e 4 são capazes de retornar próximos ao ponto inicial, enquanto que o conjugado 2 e 3 apresentam valores de espalhamento de luz compatíveis aos obtidos nas temperaturas de 50°C e 65°C, respectivamente.

Nossos resultados indicam que embora os conjugados apresentem pequenas diferenças em relação a valores de centro de massa, área espectral e EL, o grau de estabilidade dos conjugados é semelhante quando submetidos a temperaturas crescentes. A desnaturação térmica dos conjugados sucedeu de maneira análoga à desnaturação térmica das imunoglobulinas descritas na literatura, onde a transição estrutural das IgG ocorre a partir de temperaturas em torno de 50°C (VEERMAN *et al.*, 2000). Esses dados sugerem que os conjugados podem apresentar uma grande estabilidade conformacional conforme as imunoglobulinas (DUMOULIN *et al.*, 2001)

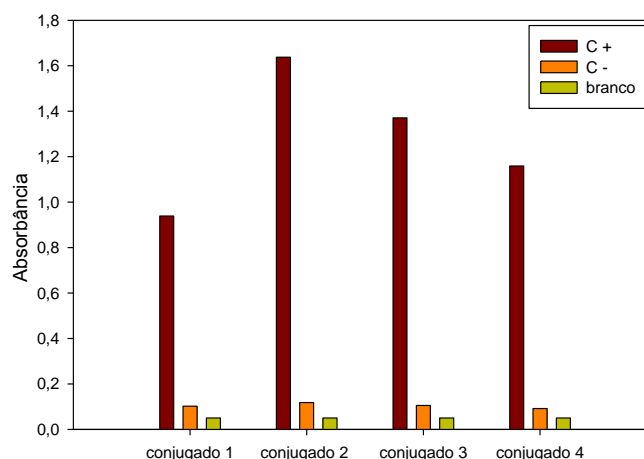
A possível propensão à agregação visualizada pelos dados de EL para alguns conjugados também é corroborada pelos dados da literatura sobre a agregação de imunoglobulinas. Diversos estudos propõem que alguns anticorpos possuem tendência a

4.10 CARACTERIZAÇÃO IMUNOLÓGICA DOS CONJUGADOS

Para verificar se os conjugados obtidos apresentariam habilidade para reconhecer os alvos em um teste de Elisa, foi necessário realizar o teste utilizando soros controles positivos e negativos. Os soros fazem parte do painel de soros negativos e positivos cedido pelo Laboratório de Tecnologia Diagnóstica (LATED) os quais foram caracterizados por exames clínico, epidemiológico, parasitológico e sorológico por RIFI, Elisa e DPP para LVC. Para este teste e demais testes de Elisa foi utilizado como Estabilizante o Guardian™ (Thermo Scientific) que mantém o conjugado com HRP, permitindo resultados consistentes imunodetectados por período de tempo prolongados (Thermo Scientific). Em adição, foram utilizadas placas revestidas com a solução de *post-coating*, um selante que tem a proposta de manter a estabilidade da placa sensibilizada em temperatura de 2°C a 8°C. Todos os conjugados foram usados na diluição de 1:20.000, que apresentou melhor nível de detecção dentre as demais diluições previamente testadas.

Foi observado, que todos os conjugados reconheceram os soros controles positivos, entretanto, a absorbância foi maior para conjugado 2 e menor para o conjugado 1 (Figura 19). Ao usar os soros controle negativos não foram observadas variações de absorbâncias significativas entre os diferentes conjugados. Como controle do teste foram realizados brancos que representam a ausência de soro e estes apresentaram pequenos valores de absorbância em torno de 0,050.

Figura 19. Análise de Elisa na diluição 1:20.000 dos conjugados 1, 2, 3 e 4. O teste foi realizado com soros controle positivo, negativo, e amostras sem soro (branco).

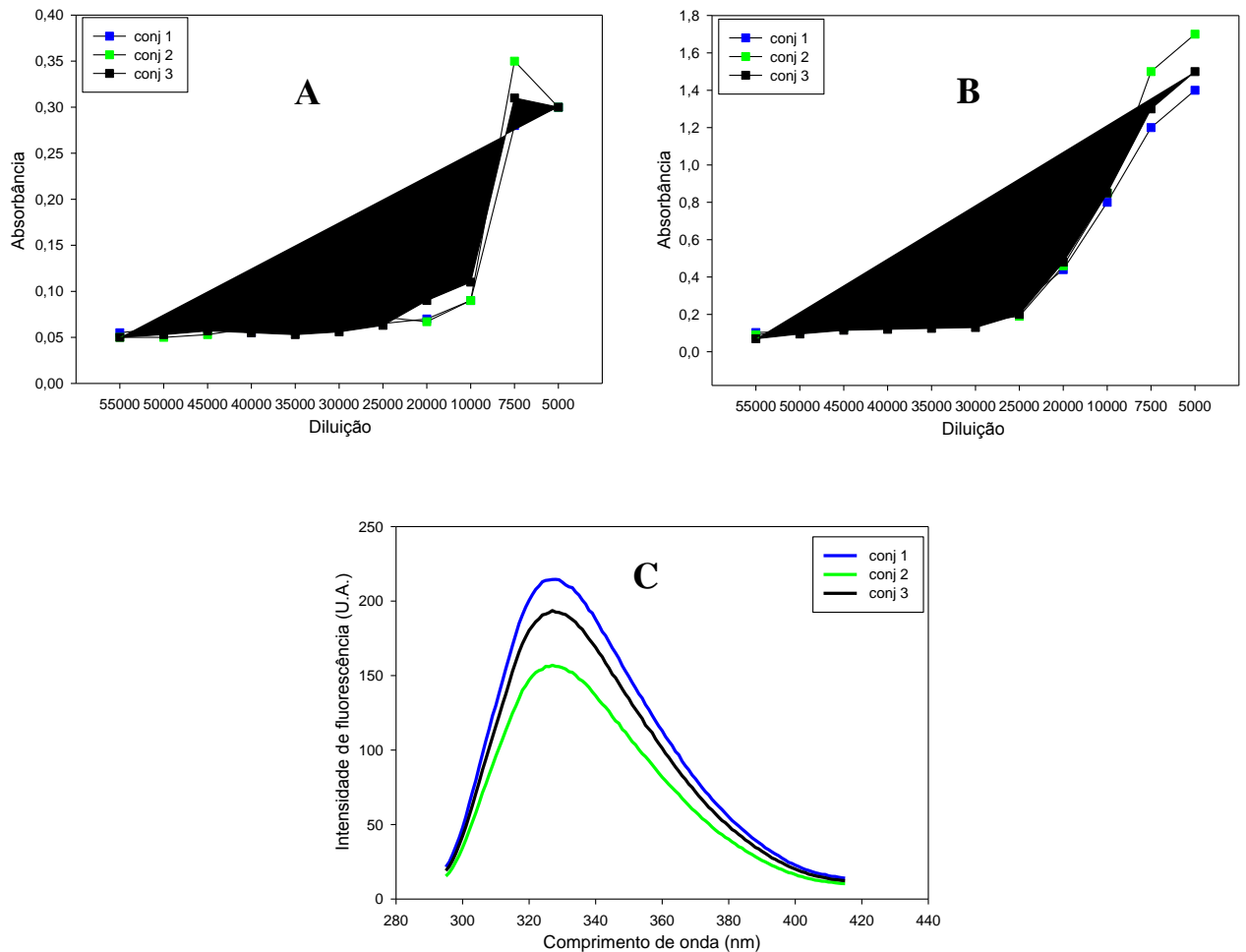


4.11 PADRONIZAÇÃO DO ENSAIO IMUNOLÓGICO PARA TESTES DE ESTABILIDADE ACELERADA

Após o teste com os controles foi necessário realizar uma nova conjugação, pois precisávamos obter o ponto inicial logo após a conjugação e, além disso, não tínhamos volume suficiente de conjugados para realizar o teste de estabilidade acelerada. Neste novo lote de conjugados utilizamos apenas os conjugados 1, 2 e 3, pois a preparação do conjugado 4 ficou inviável pelos motivos expostos no item 4.6. Nesta segunda partida de conjugados, foi realizada novamente a análise conformacional por fluorescência e foi verificado que os conjugados não apresentavam desvios nos espectros de intensidade de fluorescência (Figura 20 C), o mesmo resultado foi obtido para primeira partida de conjugados (Figura 20).

O próximo passo foi padronizar novamente a diluição dos conjugados frente a soros controle, como critério para a padronização utilizamos o item “Validação do Teste” seguindo o manual de instruções que acompanha o *kit* EIE-LVC. Neste manual é preconizado que os soros controles negativos deverão ter absorvâncias até 0,120 e os soros controles positivos até 2,0. Para este fim, foram realizadas diluições do conjugado na faixa de 55000 x até 5000 x. A média das absorvâncias obtidas em cada diluição para os controles positivos e negativos de cada conjugado foram utilizadas para se obter o gráfico demonstrado na Figura 20 A e B. Os conjugados na diluição de 5.000 ou 7.500 apresentaram os valores de absorvância compatíveis com os valores de absorvância do *kit*, porém considerando os resultados utilizando amostras do controle positivo para todos conjugados, foi verificado que a diluição de 7.500 vezes apresentava valores de absorvância mais próximos uns dos outros. Em concordância com o critério exposto acima e procurando obter a maior variação de absorvância possível entre o soro positivo e o soro negativo, a diluição dos conjugados selecionada para os próximos testes foi a de 7.500 vezes (Figura 20).

Figura 20. Representação gráfica do teste de Elisa para a escolha da melhor titulação dos três conjugados. Para esta definição, eles foram diluídos em Guardian™ 1:1000 (v/v) e posteriormente em TDA a partir de 1:5 até 1:55 e foram, posteriormente, (A) Este teste foi realizado frente a controles negativos e (B) frente a controles positivos. (C) Espectros de intensidade de fluorescência dos três conjugados.



4.12 TESTE DE ESTABILIDADE ACELERADA DOS CONJUGADOS

Os testes de estabilidade acelerada podem ser definidos como estudos projetados para acelerar a degradação química ou mudanças físicas de um produto em condições de estocagem forçadas, visando definir seu prazo de validade e período de condições de armazenamento. Os dados assim obtidos, combinados com aqueles dos estudos de longa duração, podem ser usados para avaliar alterações a longo prazo em condições não aceleradas (SILVA *et al.*, 2009).

Esta metodologia é comumente utilizada no desenvolvimento de vacinas e medicamentos (MOREFIELD, 2011), porém existem relatos na literatura sobre testes de estabilidade acelerada para avaliar a estabilidade de anticorpos (BUCHANANA *et al.*, 2013),

da HRP (FARZAMFAR *et al.*, 2007) e de conjugado a HRP (NIELSEN, 1995). O modelo de teste de estabilidade acelerada adotado nesta dissertação procurou avaliar a estabilidade do conjugado bem como a eficiência do estabilizante empregado.

Sendo assim, os estudos de estabilidade acelerada foram iniciados logo após a escolha da melhor titulação do conjugado testado frente aos controles positivo e negativo. Para este fim, foi feito um estoque de cada conjugado, diluídos no estabilizante Guardian e aliqüotados em três frascos para dar início a sequência dos testes de estabilidade dos conjugados otimizados. Desta forma, as alíquotas de cada conjugado foram identificadas e submetidas às temperaturas de 4°C, 37°C e 50°C. Para estes experimentos além das amostras controle, foram utilizadas dez amostras do painel sorológico para LVC, cinco positivas (41 a 45) e cinco negativas (81 a 85). O primeiro teste de Elisa foi realizado logo após a padronização da diluição e foi denominado de ponto zero. Com intervalos de tempo irregulares e duração de até 45 dias para as temperaturas de 4°C e 37°C e até 25 dias para a temperatura de 50°C, os testes de Elisa foram repetidos e a reatividade dos conjugados, em cada temperatura foi determinada. Vale ressaltar que estes testes foram realizados com placas com adição de *post-coating* que permite que sejam armazenadas de 2°C a 8°C.

Ao término dos testes de estabilidade acelerada o resultado obtido foi comparado entre os conjugados e entre as variadas temperaturas. Além disso, os resultados obtidos nas temperaturas de 37°C e 50°C foram comparados à Tabela (Tabela 7) contida nas instruções do fabricante do estabilizante Guardian™ (Thermo Scientific).

A Tabela 7 correlaciona o tempo de armazenamento do conjugado nas temperaturas de 50°C ou a 37°C com o tempo de armazenamento à temperatura ambiente e a 4°C.

Tabela 7.

Correlação entre o tempo de armazenamento do conjugado a 50°C ou a 37°C e a equivalência à temperatura ambiente e a 4°C.

Tempo de Incubação	50°C	37°C
1 semana	6,1 meses a 4°C	2,5 meses a 4°C
	7,7 meses a T.A.	0,7 meses a T.A.
2 semanas	12,1 meses a 4°C	4,9 meses a 4°C
	3,5 meses a T.A.	1,4 meses a T.A.
3 semanas	18,2 meses a 4°C	7,4 meses a 4°C
	5,2 meses a T.A.	2,1 meses a T.A.
4 semanas	24,3 meses a 4°C	9,8 meses a 4°C
	7,0 meses a T.A.	2,8 meses a T.A.

T.A. = temperatura ambiente

Fonte: <http://www.piercenet.com/browse.cfm?fldID=01030505> 06/02/13

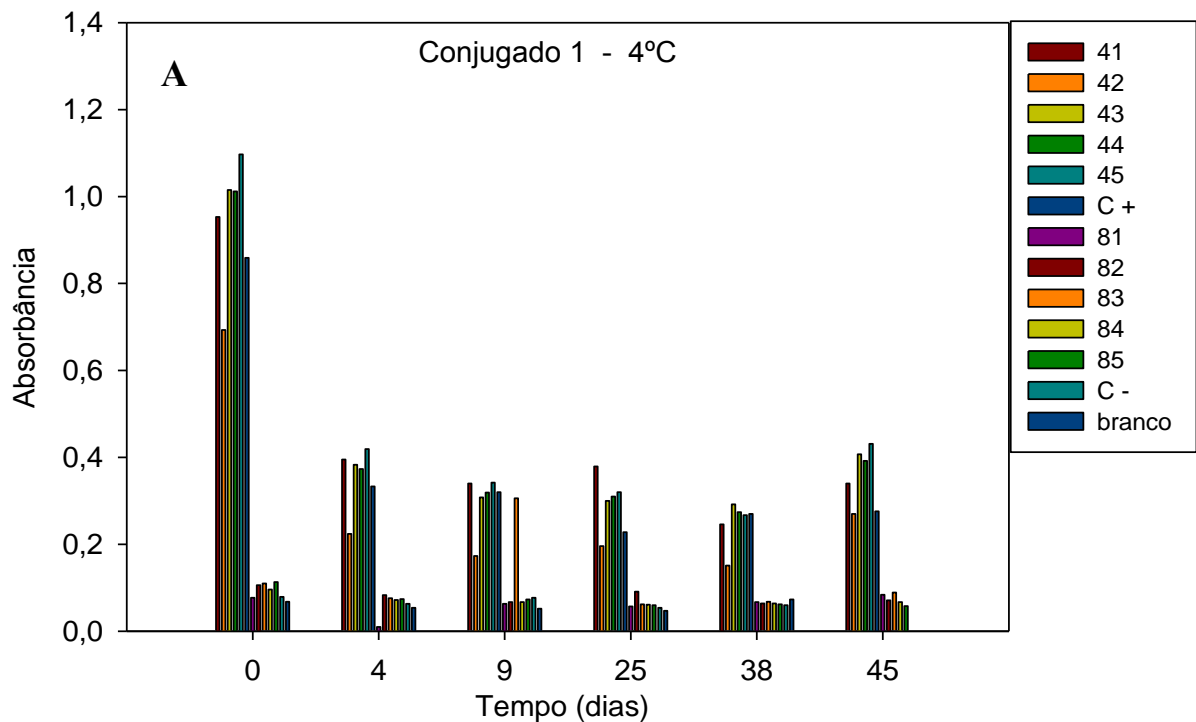
4.12.1 Elisa dos conjugados mantidos a 4°C

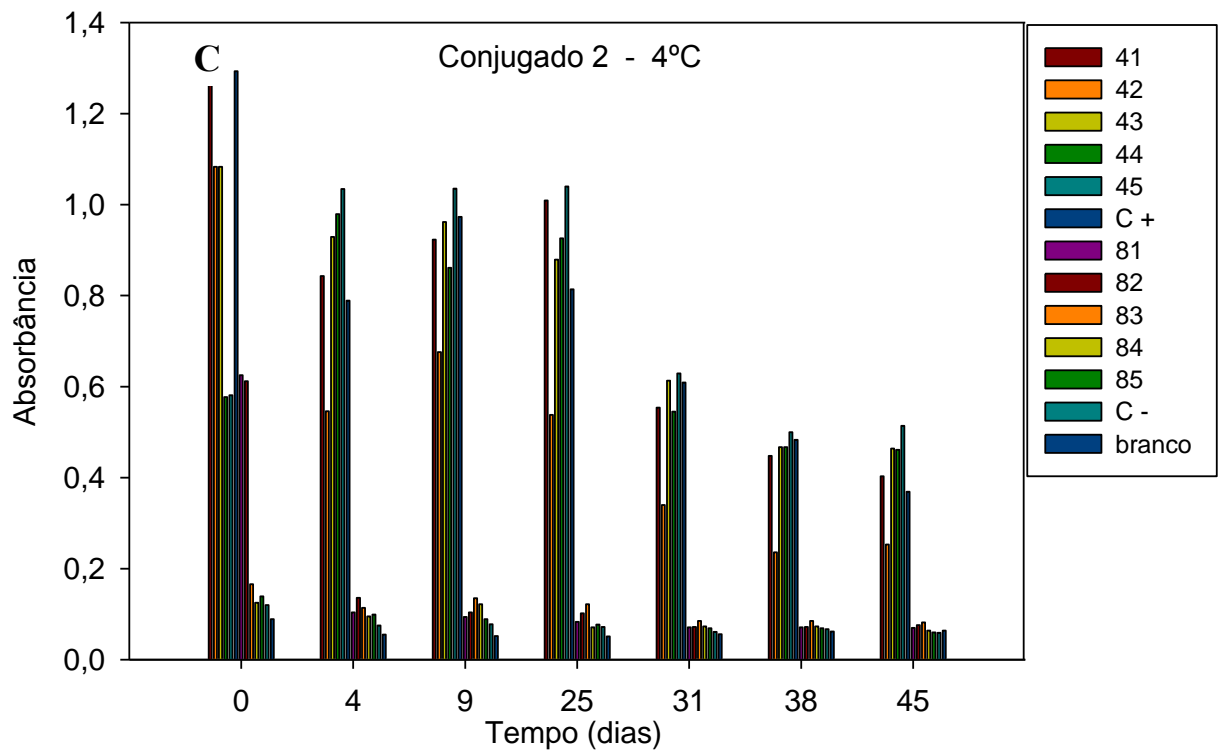
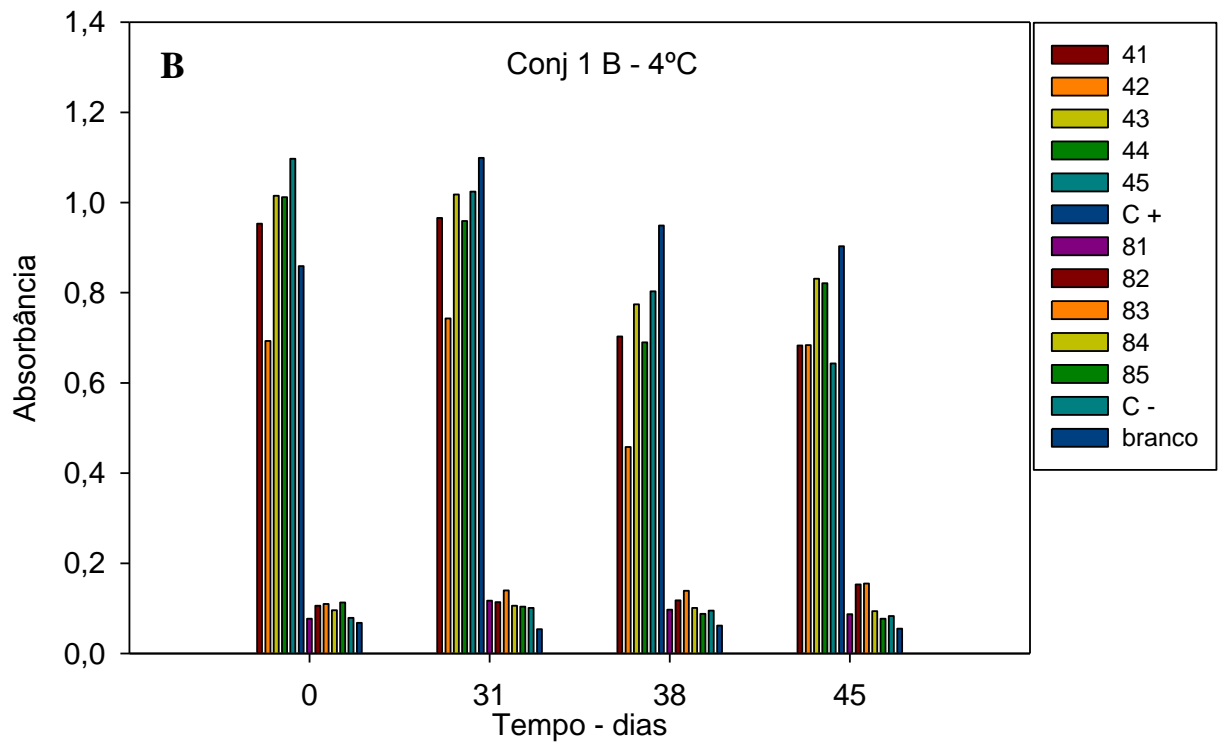
Os testes de Elisa realizados utilizando os conjugados 1, 2 e 3 submetidos à temperatura de 4°C estão representados na Figura 21. Inicialmente, o resultado obtido utilizando o conjugado 1 apresentou uma queda nas absorvâncias dos soros positivos no tempo de 4 dias, e este resultado não correspondia aos ocorridos com os demais conjugados (Figura 21 A). Então, para testar se teria havido algum problema na diluição do conjugado 1, uma nova diluição foi realizada a partir do conjugado bruto. Esta nova diluição foi realizada a fim de observar se este conjugado iria se manter estável pelo mesmo intervalo de tempo dos outros conjugados na temperatura proposta. Entretanto, só foi possível realizar esses testes após 31 dias de armazenamento para o conjugado novo que foi chamado de 1B (Figura 21 B).

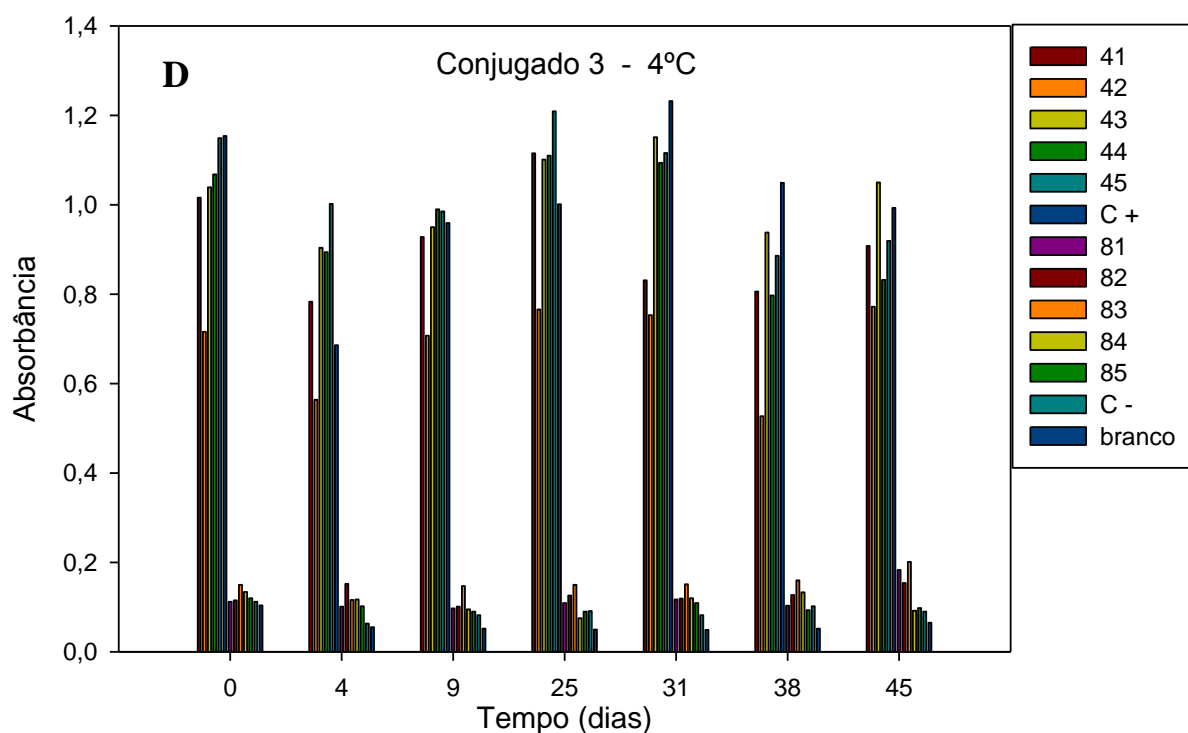
Foi observado em relação ao conjugado “1B” que, até 31 dias de armazenamento, ele mantinha valores de absorvância similares ao ponto zero. Os valores sofreram uma pequena alteração de absorvância após 31 dias de armazenamento. Em contraste, o teste utilizando o conjugado 2, apresentou uma queda nos valores de absorvância após 31 dias. O teste utilizando o conjugado 3, não apresentou uma grande variação de absorvância desde o ponto 0 ao 45º dia do experimento. Através desses dados podemos sugerir que o conjugado 3 seria o mais estável e que o conjugado 2 seria menos estável. Contudo, comparando os resultados

obtidos com todos os conjugados observou-se que o tempo de armazenagem não interferiu na eficiência de detecção dos soros positivos, bem como controles positivos e negativos, representando 100% de sensibilidade e 100% de especificidade, já que não foram detectados falsos positivos ou negativos.

Figura 21. Gráfico representativo dos testes de Elisa realizados com os conjugados armazenados a 4°C durante 45 dias. As absorvâncias obtidas utilizando os soros positivos (41 a 45), controle positivo, soros negativos (81 a 85), controle negativo e amostra sem soro (branco) frente aos conjugados (A) 1, (B) 1B (C) 2 e (D) 3 submetidos à temperatura de 4°C estão representados nas Figuras. Valor de *cut-off* médio=0,185.





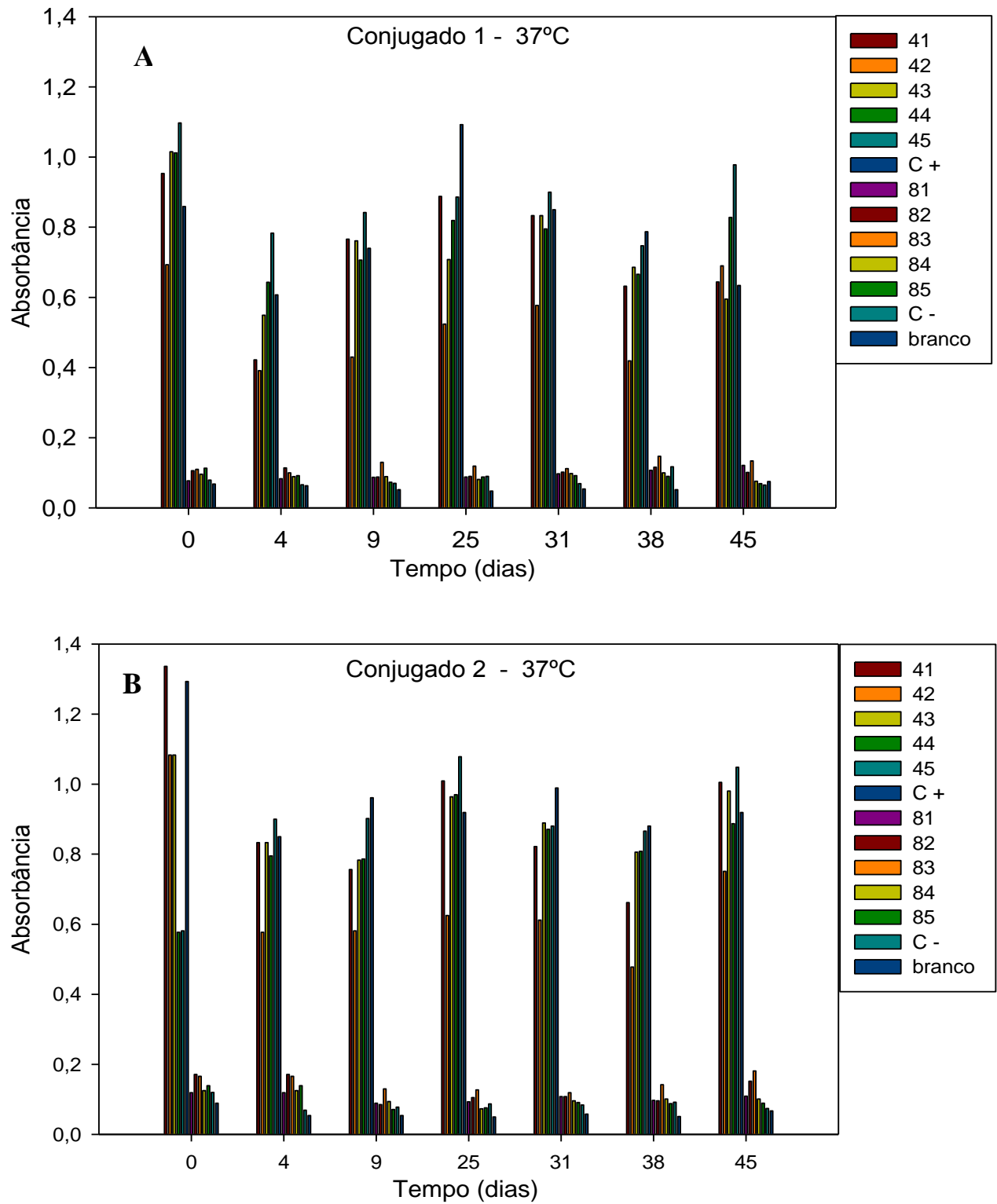


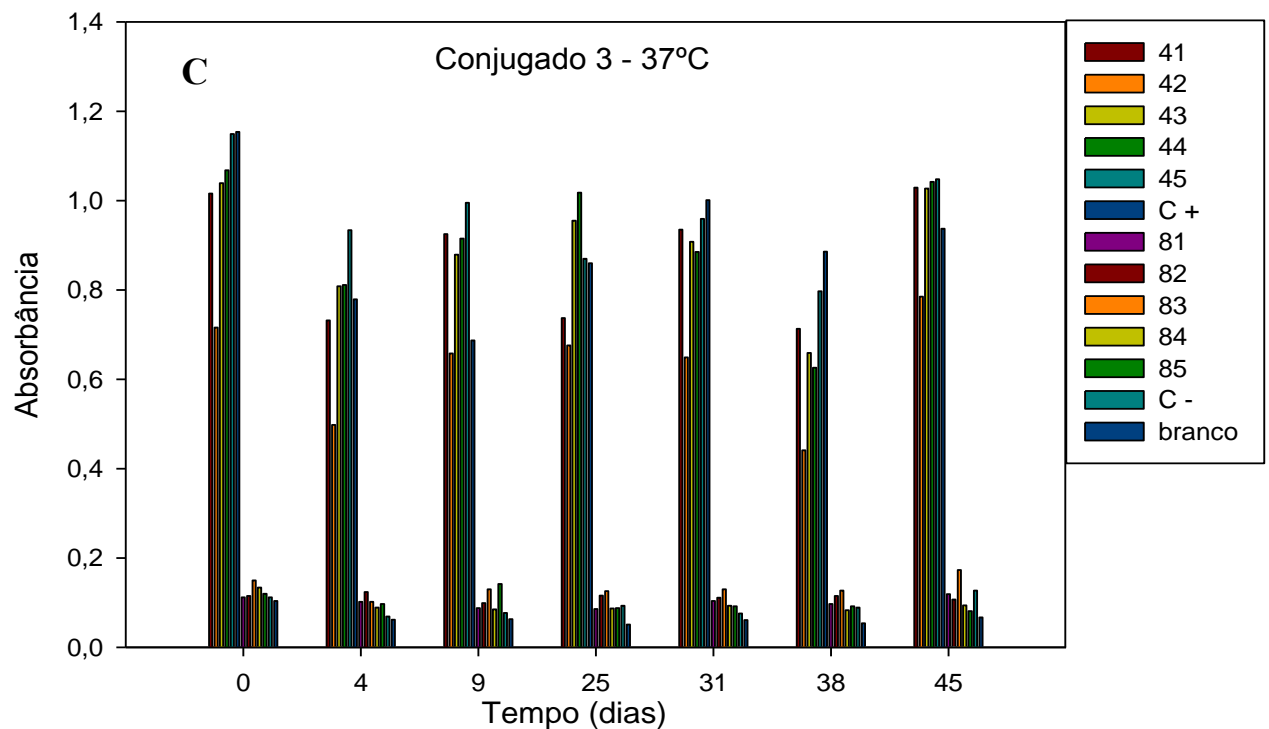
4.12.2 Elisa dos conjugados mantidos a 37°C

Os testes de Elisa realizados utilizando os conjugados 1, 2 e 3 submetidos à temperatura de 37°C estão representados na Figura 22. Foi observado que todos os conjugados apresentaram pequenas variações na absorbância desde o ponto 0 ao 45º dia do experimento, entretanto essas variações não foram suficientes para impedir a detecção dos soros controles e amostras positivas ou negativas. Assim como o teste a 4°C, não houve perda de sensibilidade e especificidade. Correlacionando o resultado obtido nos testes a 37°C com a Tabela de equivalência de estabilidade a 4°C (Tabela 7), verificou-se que os conjugados são eficientes por mais de 30 dias de armazenamento que equivalem cerca de 10 meses a 4°C.

Ao comparar os resultados dos testes de Elisa obtidos com os conjugados 1 e 3 a 4°C ou a 37°C, verificamos que estes mantiveram valores de absorbância próximos durante o período de 45 dias. Em contrapartida, o conjugado 2 apresentou maior variação dos valores de absorbância a 4°C em comparação aos valores de absorbância a 37°C.

Figura 22. Gráfico representativo dos testes de Elisa realizados com os conjugados armazenados a 37°C durante 45 dias. As absorbâncias obtidas utilizando os soros positivos (41 a 45), controle positivo, soros negativos (81 a 85), controle negativo e amostra sem soro (branco) frente aos conjugados (A) 1, (B) 2 e (C) 3 estão representados nas Figuras. Valor de *cut-off* médio = 0,171.

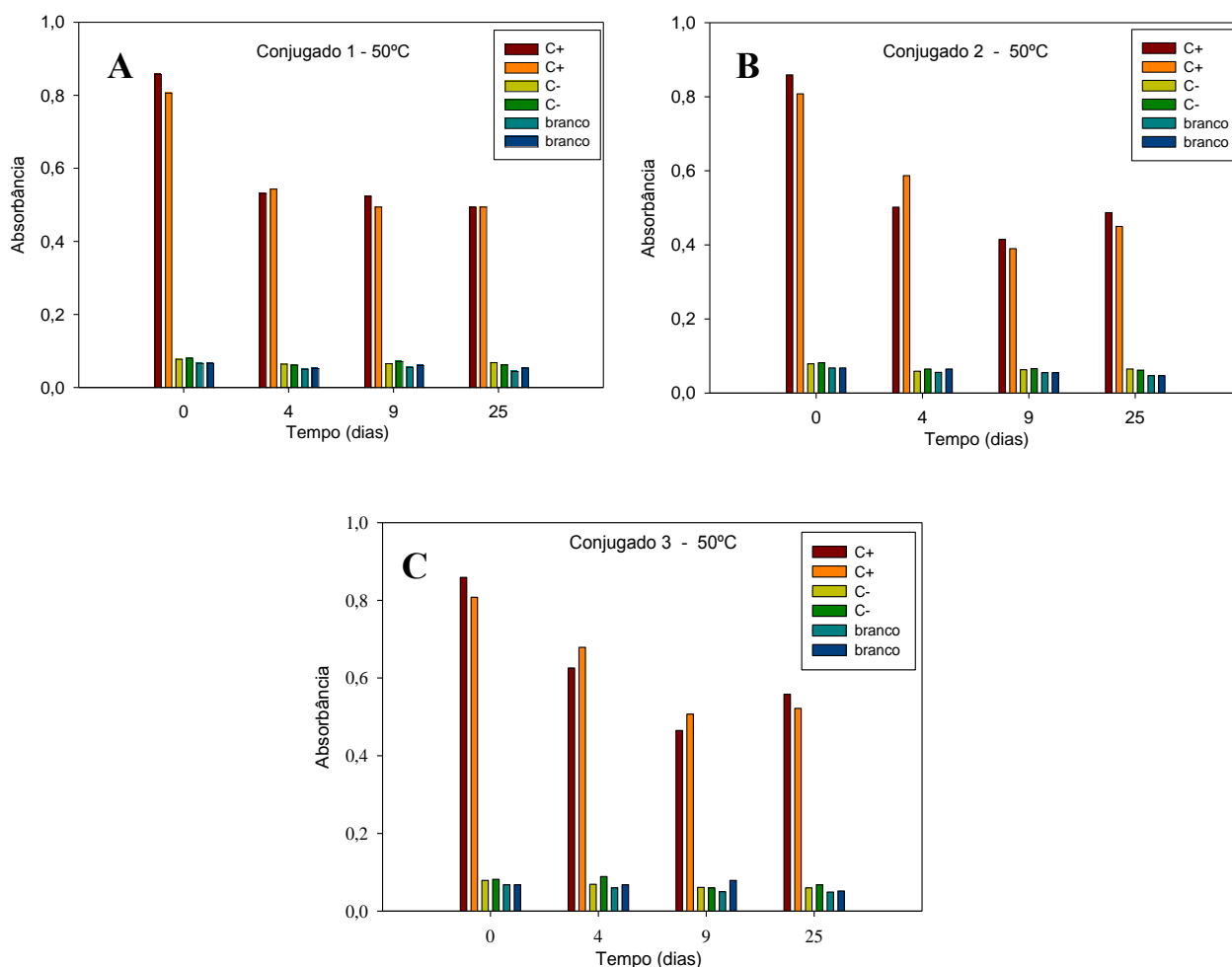




4.12.3 Elisa dos conjugados mantidos a 50°C

Os testes de Elisa realizados utilizando os conjugados 1, 2 e 3 submetidos à temperatura de 50°C estão representados na Figura 23. Os conjugados estocados a 50°C foram testados com os controles positivo e negativo e amostra sem soro (SS). Estipulamos para todos os conjugados um intervalo de 25 dias, onde observamos que houve uma pequena queda na absorbância do controle positivo após 4 dias de submissão em alta temperatura, fato que não ocorreu com controle negativo. Após a queda dos valores de absorbância, estes se mantiveram os mesmos até 25 dias de armazenamento. Conforme observado nos testes a 4°C e 37°C, a eficiência dos conjugados para detecção dos controles positivos e negativos permaneceu. No entanto, como foram usadas amostras controle não seria possível estabelecermos uma correlação com os dados de sensibilidade e especificidade. De acordo com a Tabela 7 a eficiência do conjugado diluído em Guardian™ poderia equivaler a 24 meses a 4°C.

Figura 23. Gráfico representativo dos testes de Elisa realizados com os conjugados armazenados a 50°C durante 45 dias. As absorvâncias obtidas utilizando controle positivo, controle negativo e amostra sem soro (branco) frente aos conjugados (A) 1, (B) 2 e (C) 3 submetidos à temperatura de 50°C estão representados nas Figuras.



Reunindo nossos dados de estabilidade acelerada observamos que os conjugados 1, 2 e 3 mantiveram eficiência no reconhecimento aos anticorpos mesmo em altas temperaturas, permitindo sugerir que estes apresentam estabilidade compatível para armazenamento desse insumo à temperatura de 2°C a 8°C. Conforme descrito nas instruções do fabricante, esses dados são corroborados com a descrição de que o conjugado de HRP diluído em Guardian™ é estável por 6 meses à temperatura ambiente, e mais do que 1 ano a 4°C (Thermo Scientific).

Atualmente, o setor de produção de Bio-Manguinhos tem um grande problema na logística de armazenagem e distribuição (transporte) de um *kit* EIE-LVC que tem parte dos componentes mantidos a 4°C e a outra parte a -20°C. A manutenção dos insumos à temperatura de -20°C representa um alto custo para Bio-Manguinhos, e a possibilidade de armazenagem desses insumos a temperaturas de 2°C a 8°C seria considerada um grande avanço no processo de produção do *kit* EIE-LVC.

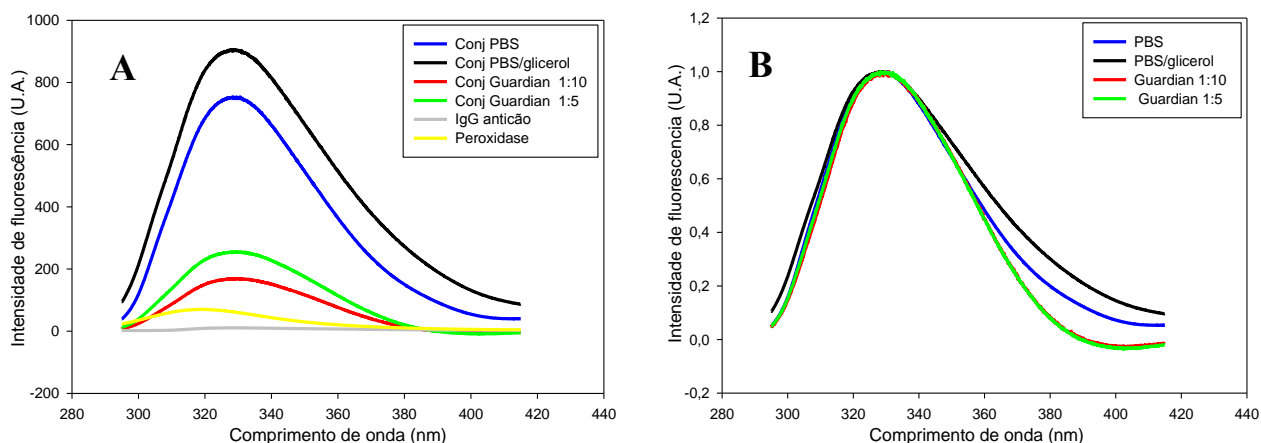
4.13 COMPARAÇÃO ENTRE OS ESTABILIZANTES PBS/GLICEROL E GUARDIAN

Após a observação de que o estabilizante Guardian™ poderia ser utilizado para facilitar o armazenamento do kit, foi preciso analisar esses resultados em comparação ao estabilizante atual. Realizamos então a análise conformacional e um teste de Elisa dos conjugados diluídos nos dois estabilizantes.

4.13.1 Análise conformacional

A análise conformacional foi obtida através dos ensaios de fluorescência, nestes ensaios foi analisado o conjugado 2 nas seguintes diluições: diluído 1:5 e 1:10 em Guardian™, ou diluído em PBS ou diluído no estabilizante PBS/glicerol 70% (v/v). Os resultados nos indicam que embora a área espectral do conjugado tenha variado em função da concentração (Figura 24 A) não ocorreram desvios de espectro de intensidade de fluorescência evidenciado através da normalização dos espectros (Figura 24 B). Esses resultados suportam a ideia de que o estabilizante não interfere na estrutura do conjugado e poderia ser utilizado nos processo de produção.

Figura 24. Análise conformacional dos conjugados por fluorescência. (A) Espectros de emissão de fluorescência bruta. (B) Espectros de emissão de fluorescência normalizada. Conjugado diluído em PBS (azul), conjugado diluído em PBS-glicerol (preto), conjugado diluído em Guardian™ 1:10 (vermelho), conjugado diluído em Guardian™ 1:5 (verde), IgG (rosa) e HRP (amarelo). Todas as medidas foram realizadas a 25°C.



4.13.2 Teste de ELISA

A fim de testar a eficiência dos conjugados diluídos em Guardian™ e comparar com o conjugado diluído no estabilizante do *kit* e insumos produzidos nas condições atuais, testamos o painel sorológico com 20 amostras positivas de soro e 20 amostras negativas de soro para leishmaniose visceral canina (Figura 25).

Utilizamos neste ensaio um Kit EIE-LVC – Bio-Manguinhos composto de 4 placas sensibilizadas, controle positivo, controle negativo e demais insumos que acompanham o *kit*. Também utilizamos todos os insumos dos testes anteriores, tais como: os controles positivo e negativo, placas mantidas a 4°C conservadas pelo *post-coating*, e os conjugados 1, 2 e 3 mantidos a 4°C e a 37°C. Os testes foram realizados com as seguintes combinações:

- a) Placa –20°C x conjugado 1 / 4°C ou 37°C
- b) Placa –20°C x conjugado 2 / 4°C ou 37°C
- c) Placa –20°C x conjugado 3 / 4°C ou 37°C
- d) Placa –20°C x conjugado *kit* (*Kit* atual)
- e) Placa 4°C x conjugado *kit*

Para cada teste foi determinado a linha de corte (*cut-off*) a partir do cálculo da média do controle negativo multiplicado por 2, conforme é determinado pelo manual de instruções de uso do *Kit* EIE – Leishmaniose Visceral Canina/Bio-Manguinhos. Vale ressaltar que em todos os testes foi obtido um valor semelhante de linha de corte, gerando um valor médio de 0,150 (Figura 25).

As placas do *kit* EIE-LVC armazenadas a -20°C receberam a adição dos 3 diferentes conjugados mantidos a 4°C ou a 37°C. Foi observado que os conjugados mantidos a 4°C apresentaram valores de absorbância semelhantes entre si. Os conjugados mantidos a 37°C apresentaram valores de absorbância semelhantes entre si e abaixo dos valores de absorbância obtidos para os conjugados a 4°C, esse fato pode ser explicado devido ao tempo de permanência dos conjugados conservados a 37°C por 72 dias (Figura 25).

O conjugado do *kit* EIE-LVC (-20°C) foi testado utilizando as placas que são mantidas a -20°C e com a placa mantida a 4°C. Verificamos que não houve muita diferença de reatividade do conjugado quando utilizamos a placa 4°C em comparação com a placa -20°C, porém o valor de especificidade (E=85%) foi maior quando foram usadas as placas a 4°C (Figura 25, Tabela 8).

Correlacionando os dados obtidos com o conjugado do *kit* (-20°C) com os conjugados diluídos em Guardian™ (4°C ou 37°C), verificamos que os valores de absorvância para as amostras positivas são maiores para o conjugado atual, e isso pode ser atribuído ao fato de o conjugado apenas ser aprovado para compor o kit, quando este alcança valores de absorvância preconizados no manual do *kit* EIE-LVC. Ao compararmos os resultados utilizando todos os conjugados verificamos que estes detectaram as amostras positivas e negativas, com valores de absorvância que permitem a distinção entre as amostras e que estes valores estão dentro de uma faixa aceitável, de acordo com o manual do *kit*. Sendo assim, sugerimos que os conjugados obtidos sob as novas condições, o estabilizante Guardian™ e as placas a 4°C poderiam ser utilizados para aumentar a validade dos *kits* e facilitar o processo de produção.

Os valores de especificidade e sensibilidade foram calculados para cada teste e estão descritos na Tabela 8. Para todos os conjugados não houve a detecção de falso negativo, obtendo-se valores de 100% de sensibilidade. A detecção de falso positivo nos testes permitiu variações de especificidade de 75 a 100%. Entretanto, ao observar os resultados obtidos com os conjugados 1, 2, 3 a 4°C, verificamos que o conjugado 3 apresentou maior valor de especificidade que os demais. Esta constatação somada a maior estabilidade desse conjugado observada nos testes de estabilidade a 4°C, obtidos nesta dissertação (Figura 21 D), nos indicam que o conjugado 3 poderia ser uma boa alternativa para a produção do *kit* EIE-LVC Bio-Manguinhos.

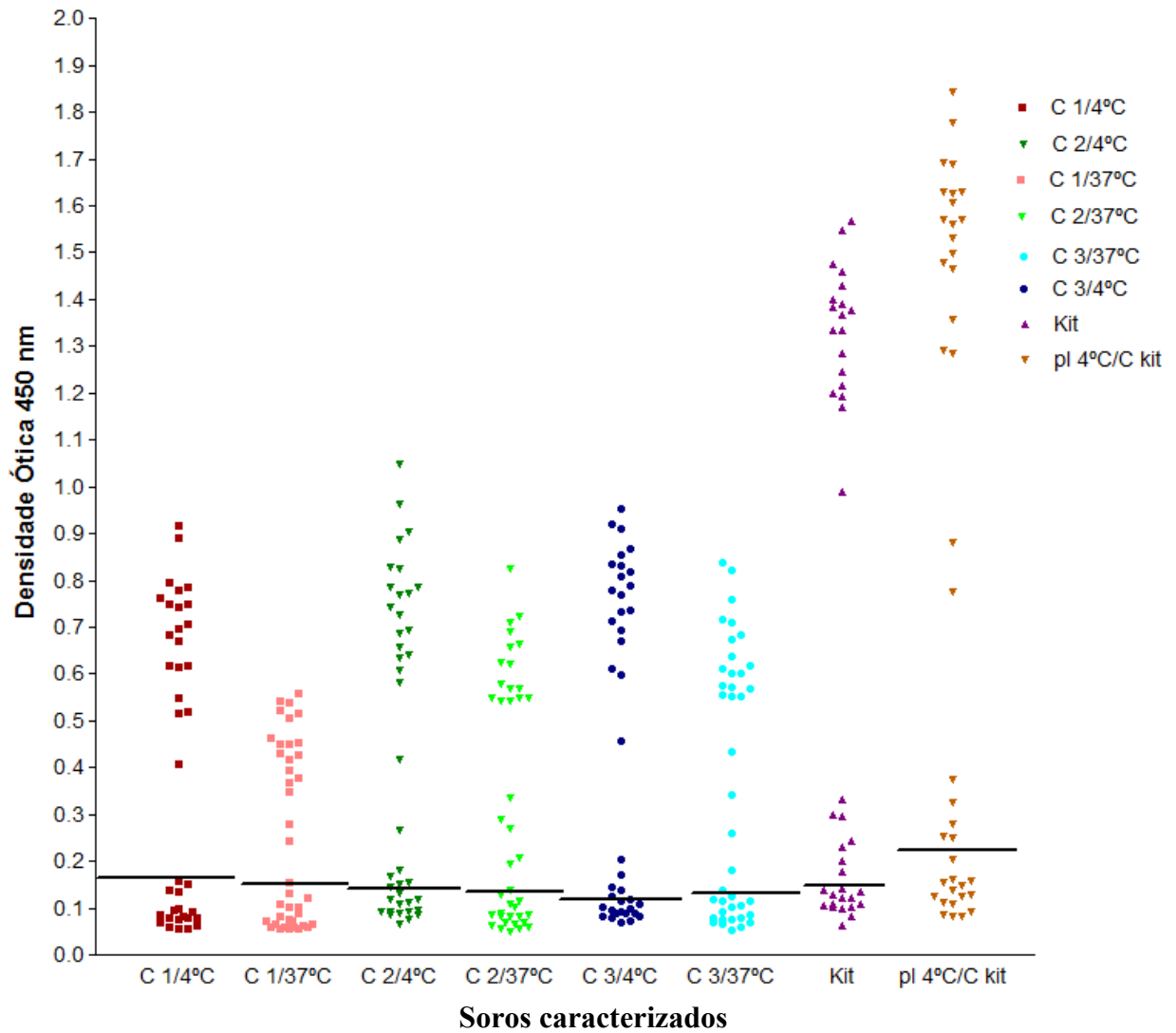
Tabela 8.

Valores de sensibilidade e especificidade dos testes de Elisa utilizando os conjugados 1, 2 e 3 submetidos a temperaturas de 4°C e 37°C em placas estocadas a -20°C (*kit*) e placas estocadas a 4°C.

	placas do kit -20°C						placa kit	placa 4°C
	Conjugado 1		Conjugado 2		Conjugado 3		Conj Kit	Conj Kit
	4°C	37°C	4°C	37°C	4°C	37°C	-20°C	-20°C
Temperatura dos conjugados	4°C	37°C	4°C	37°C	4°C	37°C	-20°C	-20°C
Especificidade	85%	100%	75%	85%	90%	85%	75%	85%
Sensibilidade	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%

Conj = conjugado

Figura 25. Análise dos valores de absorbância a 450 nm obtidos utilizando os conjugados diluídos em Guardian™ e conjugado do *kit* (-20°C), frente as amostras de soros caninos positivos e negativos para leishmaniose. Placa -20°C x conjugado 1 / 4°C e 37°C (Quadrado vermelho e rosa respectivamente), placa -20°C x conjugado 2 / 4°C e 37°C (triângulo verde escuro e verde claro respectivamente), placa -20°C x conjugado 3 / 4°C e 37°C (círculo azul claro e azul escuro, respectivamente), placa -20°C x conjugado do *kit* (triângulo lilás), placa 4°C x conjugado *kit* (triângulo marrom). A faixa preta representa cada uma das linhas de corte (*cut-off*) referente a aos controles negativos de cada teste.



C 1 = conjugado 1, C 2 = conjugado 2, C 3 = conjugado 3, pl = placa, C *kit* = conjugado do *kit*

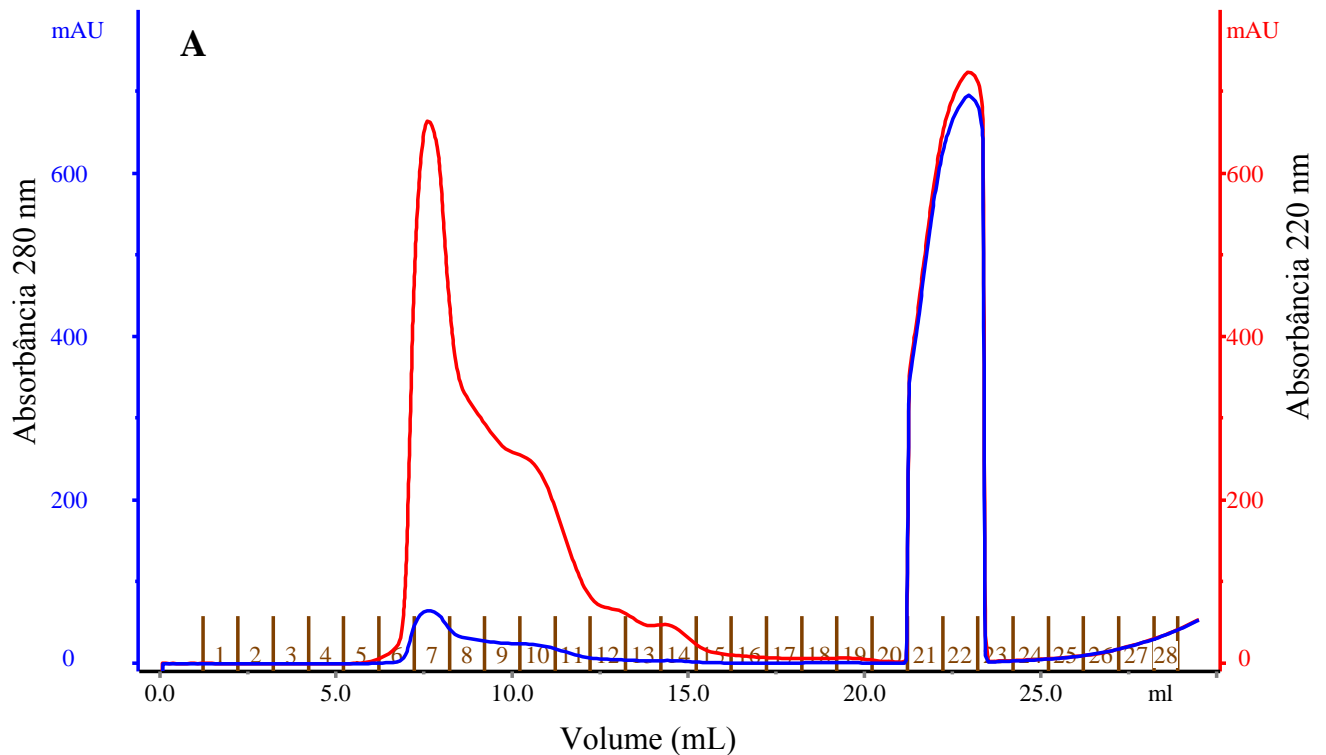
4.14 ANÁLISE DAS FRAÇÕES REFERENTES AOS PICOS DO CONJUGADO 2 ORIUNDAS DA CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE EXCLUSÃO E PENEIRAÇÃO MOLECULAR

Em paralelo aos testes de estabilidade, para analisar as possíveis diferenças entre as duas populações de conjugado visualizadas através da cromatografia analítica (Figura 26), o conjugado 2 foi submetido a uma cromatografia de exclusão e peneiração molecular utilizando uma coluna superdex 200 HR 10/30, a fim de isolar as frações que compõem o pico 1 e 2 previamente observadas na Figura 26 C. Como representativo do pico 1 foi isolada a fração 7 e como representativo do pico 2 foram isoladas as frações 8, 9, 10. De posse das frações referentes as duas populações de conjugado, estas foram analisadas em relação à conformação e à habilidade de reconhecimento de anticorpos.

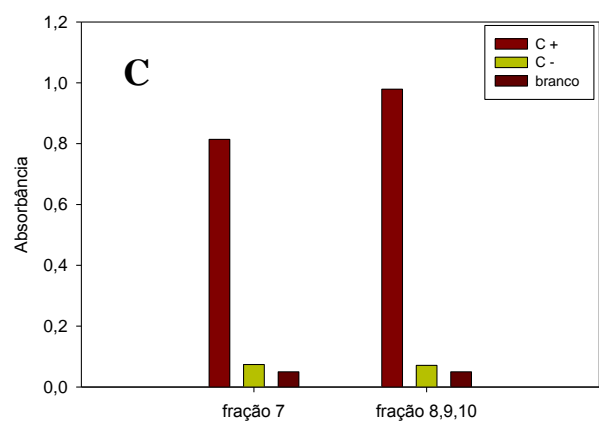
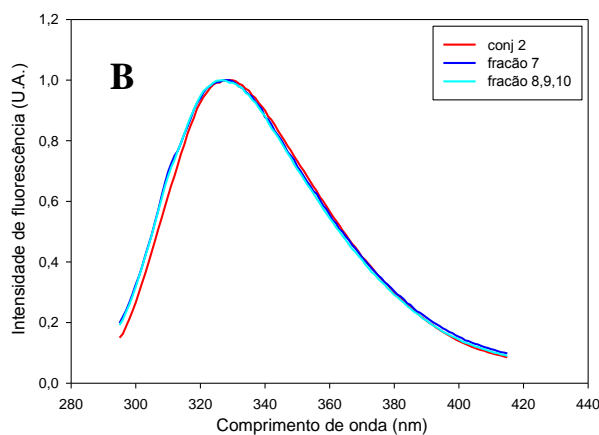
Para análise da conformação foram realizados espectros de fluorescência das frações referentes aos picos cromatográficos e do conjugado antes do fracionamento contendo as duas populações de conjugado. Após a normalização dos espectros, pode se verificar que estes não apresentavam desvios de espectro, o que seria indicativo de uma mudança conformacional mais brusca (Figura 26 A). Os espectros das diferentes populações de conjugado apresentaram variações na área de intensidade de fluorescência devido às diferenças de concentração (Figura 26 A).

Em seguida, foram realizados testes de Elisa com as duas diferentes populações e estas foram capazes de reconhecer o anticorpo gerando resultados esperados ao utilizar controles positivos e negativos (Figura 26 B).

Figura 26. Análise das frações obtidas durante o processo de separação de frações que compõem o conjugado 2 (pico 1 - fração 7 e pico 2 frações 8, 9 e 10). (A) Separação de frações cromatográficas do conjugado 2 pelo método de SEC – A coluna Superdex 200 de 24 mL de volume total foi equilibrada em Tampão Fosfato de Sódio, pH 7,0, com um fluxo de 1 mL/min, pressão máxima de 1.5 Mpa e a absorbância foi detectada em 220 nm (vermelho) e 280 nm (azul). O volume injetado do conjugado 2 foi de 1 mL e o fracionamento foi de 1 mL. (B) Espectros de intensidade de fluorescência do conjugado 2 e das frações da cromatografia. (C) Representação gráfica do teste de Elisa utilizando as duas frações cromatográficas do conjugado 2 e os controles negativo e positivo.



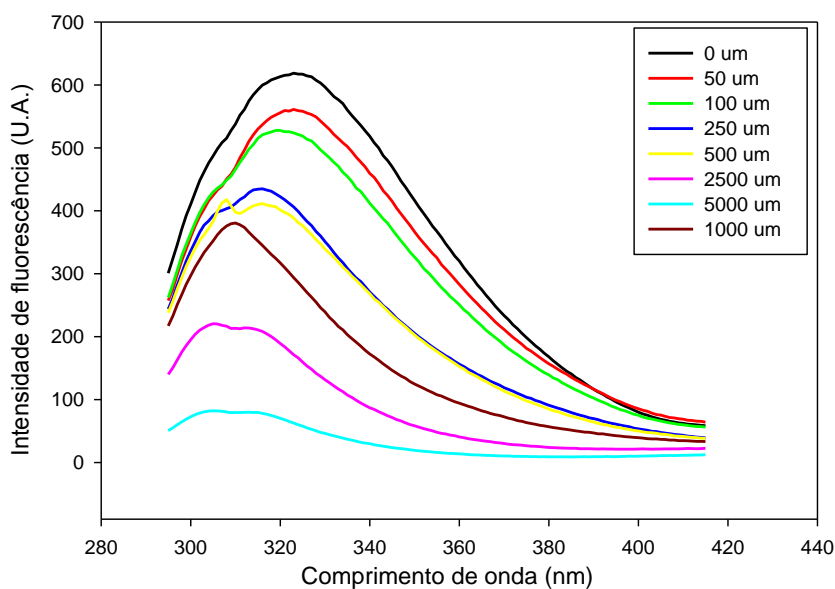
Fonte: Programa gráfico computacional Unicorn versão 5.11 Akta Purifier 100 (GE Healthcare).



4.15 ANÁLISE CONFORMACIONAL DA HRP NATIVA E OXIDADA POR METAPERIODATO DE SÓDIO

Para verificar se existe diferença conformacional entre a HRP nativa e oxidada foi realizada uma curva de concentração de metaperiodato de sódio entre 50 a 5000 μM . Após a incubação da HRP na ausência e na presença do metaperiodato, os espectros de intensidade de fluorescência foram obtidos a cada concentração. Foi verificada uma diminuição da área espectral de fluorescência após a ativação da HRP e esta diminuição de área espectral foi dependente de concentração. Esses dados sugerem que existe diferença conformacional entre a peroxidase nativa e oxidada, e que a mudança conformacional deve ser devido à mudança no ambiente químico do triptofano após a adição do metaperiodato de sódio. A curva foi realizada nas concentrações descritas acima, visto que concentrações superiores de metaperiodato de sódio impediram a visualização dos espectros.

Figura 27. Espectros de intensidade de fluorescência da HRP em diferentes concentrações de metaperiodato de sódio. A variação ocorreu de 50 até 5000 μM . Os espectros foram feitos a temperatura de 25°C.



5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

É interessante observar que até o momento a produção de conjugados, ainda que seguindo rigorosamente as etapas de produção dentro das BPF, não implementou novas técnicas no processo de purificação da IgG e a conjugação à HRP. Nesta dissertação, primeiramente, foram realizadas otimizações no processo de obtenção da imunoglobulina. Neste contexto, sugerimos a substituição das técnicas de diálise e cromatografia de troca iônica em DEAE Sephacel (GE Healthcare) pela dessalinização e cromatografia de troca iônica em poros HQ.

Outra abordagem utilizada nesta dissertação foi realizar a caracterização físico-química e imunológica tanto da imunoglobulina como do conjugado a fim de obter mais informações acerca da IgG e do conjugado IgG-HRP. Esta caracterização também teve o objetivo de selecionar técnicas que possam ser usadas como controles de processo e estender o uso dessas metodologias para o processo de produção. Sendo assim, sugerimos que as etapas de quantificação proteica, SDS-PAGE, IEF-PAGE, SEC, fluorescência e dicroísmo circular possam ser incorporadas como controles de processo ao processo de produção para análise conformacional dos conjugados obtidos.

Para testar a melhor relação de metaperiodato de sódio e borohidreto de sódio no processo de conjugação por aminação redutiva, foram produzidos 4 tipos de conjugados. Ao compararmos os resultados obtidos com os diferentes tipos de conjugados, pode-se observar que estes não apresentaram resultados muito discrepantes. No entanto, o conjugado produzido com maior concentração de metaperiodato de sódio (Conjugado 3) pode representar um ganho para o processo de produção, visto que este apresentou melhor resultado nos testes de Elisa a 4°C, manteve a estabilidade durante 45 dias nos testes de estabilidade acelerada e apresentou valor de especificidade (E=90%) em Elisa comparativo (Figura 25). Além disso, de acordo com os dados da SEC, o conjugado 3 apresenta maior conteúdo de conjugados com maior massa molecular (macroconjugado) e não apresenta HRP livre após a conjugação (Figura 16 B). Segundo Hermanson, 2008, a seleção dos tipos de complexos anticorpo-enzima de acordo com a massa molecular é importante, pois a habilidade de reconhecimento do conjugado depende do ensaio no qual este será aplicado. Neste contexto, os macroconjugados são mais apropriados para os testes de Elisa e testes em microplacas (HERMANSON, 2008).

Com a finalidade de avaliar um novo conjunto de insumos, a saber: conjugados obtidos sob novas condições, placas revestidas com a solução *post-coating* e o estabilizante

Guardian™ foram realizados testes de estabilidade acelerada. Estes testes apresentaram resultados favoráveis indicando que estes insumos podem ser utilizados para armazenagem do *kit* EIE-LVC na temperatura de 2°C a 8°C.

Apesar do conhecimento de que toda modificação no processo de produção no que se refere à legislação, precisa ser feita com a anuência da ANVISA. Tais medidas precisam ser avaliadas e oportunamente executadas mediante os resultados desta dissertação. Dessa forma, a introdução de novas etapas bem como a otimização de etapas existentes no processo de produção dos conjugados permitirá a modernização no processo de produção com intuito de obter conjugados cada vez mais reprodutíveis. Esse projeto amplia o conhecimento imunológico e físico-químico em torno dos conjugados IgG-HRP, vistos anteriormente apenas como uma ferramenta de trabalho e inicia a busca pela qualidade de produção de insumos componentes dos kits de diagnóstico.

6 CONCLUSÕES

1. As etapas para obtenção da imunoglobulina, como a etapa de dessalinização em conjunto com a purificação de troca iônica em coluna Poros HQ podem ser implementadas visando a produção do *kit* EIE-LVC em um período menor de tempo.
2. As etapas como SDS-PAGE, quantificação por BCA, IEF, fluorescência e dicroísmo circular podem ser inseridas na produção do *kit* EIE-LVC como controles de processo dos conjugados produzidos.
3. Os conjugados produzidos com um pequeno acréscimo de metaperiodato de sódio representaram um aumento de estabilidade do conjugado segundo os dados de caracterização imunológica por Elisa.
4. Os conjugados obtidos sob novas condições em conjunto com as placas revestidas com a solução *post-coating* e o estabilizante Guardian™ podem ser utilizados para armazenagem do *kit* EIE-LVC na temperatura de 2°C a 8°C.

REFERÊNCIAS

ASSOCIAÇÃO DOS LABORATÓRIOS FARMACÊUTICOS OFICIAIS DO BRASIL. Bio-Manguinhos – Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos. Disponível em: <http://alfob.org/BioManguinhos.htm>. Acesso em 06 fev. 2013.

BERG, J.M.; TYMOCZKO, J.L.; STRYER L. **Bioquímica**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009.

BIENIARZ, C.; YOUNG, D.F.; CORNWELL, M.J. Thermally stabilized immunoconjugates: conjugation of antibodies to alkaline phosphatase stabilized with polymeric cross-linkers **Bioconjugate Chem.** v. 9, p. 399-402, 1998.

BIO-MANGUINHOS - Fundação Oswaldo Cruz. Disponível em: http://www.bio.fiocruz.br/interna/desenvolvimento_tecno.htm. Acessado em: 05/07/07.

BIO-MANGUINHOS – História. Disponível em: <http://www.fiocruz.br/bio/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=185>. Acesso em: 20 dez. 2009.

BIO-MANGUINHOS. Departamento de Reativos para Diagnóstico. Relatório Anual, 2010.

BIO-MANGUINHOS. Produtos. Portfólio. Disponível em: <http://www.bio.fiocruz.br/index.php/produtos/portifolio> . Acesso em: 24 set. 2011.

BIO-MANGUINHOS – Produtos. Fornecimento. Disponível em: <http://www.bio.fiocruz.br/index.php/secretaria-de-vigilancia-em-saude-e-bio-manguinhos>. Acesso em: 22/01/2013.

BISUGO, M. C. et al. Assessment of canine visceral leishmaniasis diagnosis by means of a rapid test using recombinant antigen K39 in endemic regions of São Paulo state, Brazil. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 66, n. 2, p. 185-193, 2007.

BOARINO, A. et al. Application of a recombinant protein for the serological diagnosis of canine leishmaniasis. **Comp Immunol Microbiol Infect Dis**, v. 31, n. 6, p. 527-36, 2008.

BRASIL. Lei nº 8.080, de 19 de setembro de 1990. Dispõe sobre as condições para a promoção, proteção e recuperação da saúde, a organização e o funcionamento dos serviços correspondentes e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 20 set. 1990. Disponível em: <http://www.saude.inf.br/legisl/lei8080.htm>. Acesso em: 22 set. 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral**. Brasília, 2003. 120 p. Disponível em: http://www.portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/manual_leish_visceral2006.pdf. Acesso em: 15 out. 2012.

BUCHANANA, A. et al. Engineering a therapeutic IgG molecule to address cysteinylolation, aggregation and enhance thermal stability and expression. **Landes Bioscience**. v. 5, n. 2, p. 255–262, 2013.

BURNS-JR, J. M. et al. Molecular characterization of a kinesin-related antigen of *Leishmania chagasi* that detects specific antibody in African and American visceral leishmaniasis. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 90, n. 2, p. 775–779, 1993.

CABREIRA, M.A.A. **Ciclo enzoótico de transmissão da *Leishmania (Leishmania) chagasi* (Cunha e Chagas, 1937) no ecótopo peridoméstico em Barra de Guaratiba, Rio de Janeiro-RJ: estudo de possíveis variáveis preditoras**. 1999. Dissertação (Mestrado Saúde Pública) – Escola Nacional de Saúde Pública, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 1999.

CHAPPUIS, F. et al. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? **Nat Rev**, v. 5, p. 873-882, 2007.

CHIODI, F.; SIDÉN, A.; ÖSBY, E. Isoelectric Focusing of monoclonal immunoglobulin G, A and M followed by detection with the avidin-biotin system. **Electrophoresis**, v. 6, n. 3, p. 124–128, 1985.

CORRÊA, D.H.A.; RAMOS, C.H. The use of circular dichroism spectroscopy to study protein folding, form and function. **African Journal of Biochemistry Research**. São Paulo. v. 3, n. 5, p. 164-173, mai. 2009.

CUNNINGHAM, A.C. Parasitic adaptive mechanisms in infection by *Leishmania*. **Experimental and Molecular Pathology**, n.72, p. 132-141, 2002.

DAVIS, D.R.; PADLAN, E.A.; SHERIFF, S. Antibody-antigen complexes. **Annu Rev Biochem**. v. 59, p. 439-473, 1990.

DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Comp Immunol, Microbiol Infect Dis**, v. 27, p. 305–318, 2004.

DONOVAN, C. On the possibility of the occurrence of trypanosomiasis in India. **J Brasil Med**, v. 2, p. 79, 1903.

DHAWAN, S. Design and construction of novel molecular conjugates for signal amplification (I): conjugation of multiple horseradish peroxidase molecules to immunoglobulin via primary amines on lysine peptide chains. **Peptides**, v. 23, p. 2091–2098, 2002.

DUMOULIN, M. et al. Single-domain antibody fragments with high conformational stability. **Protein Sci**, v. 11, n. 3, p. 500-15, 2002.

ENGVALL, E.; JONSSON, K.; PERLMANN, P. Enzyme-linked immunosorbent assay. II. Quantitative assay of protein antigen, immunoglobulin G, by means of enzyme-labelled antigen and antibody-coated tubes. **Biochim Biophys Acta**, n. 251, v. 3, p. 427-34, 1971.

FARZAMFARA, B. et al. The effect of different stabilizers on stability of horseradish peroxidase-bovine serum albumin-aflatoxin B1, a conjugated tracer for detection of aflatoxin B1 in immunoassay-based methods. **IJPR**, v. 6, n. 3, p. 79-184, 2007.

FEITOSA, M. M. et al. Aspectos clínicos de cães com leishmaniose visceral no município de Araçatuba- São Paulo (Brasil). **ClínVet**, v. 5, n. 28, p. 36-44, 2000.

FIOCRUZ. Produção – Reagentes para diagnóstico. Disponível em: <http://www.fiocruz.br/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=78>. Acesso em: 22 jan. 2013.

FOGUEL, D.; SILVA, J.L.; GAY, P.G. Characterization of a partially folded monomer of the DNA-binding domain of human papillomavirus E2 protein obtained at high pressure. **J Biol Chem**, v. 273, p. 9050-9057, 1998.

Fundação Nacional de Saúde (FUNASA). **Boletim Epidemiológico. Ano III:1-8**. Brasília, 1999. Disponível em: <http://www.funasa.gov.br>. Acesso em: 12 ago. 2005.

Fundação Nacional de Saúde (FUNASA). **Manual de Controle da Leishmaniose Tegumentar Americana**. Brasília, 2002. Disponível em: <http://www.funasa.gov.br>. Acesso em: 12 ago. 2005.

GAGNON, P. Technology trends in antibody purification. **J Chromatogr A**, v. 1221, p. 57-70, 2012.

GAJHEDE, M. et al. Crystal structure of horseradish peroxidase C at 2.15 angstrom resolution. **Nature Struct. Biol.** n. 4, p. 1032–1038, 1997.

GONTIJO, B; CARVALHO. M.L.R. Leishmaniose Tegumentar Americana. **Rev Soc Brasil Medic Trop**, n. 36, v.1, p. 71-80, 2003.

GONTIJO, C.M.F.; MELO, M.N. Leishmaniose Visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. **Rev bras epidemiol**, v. 7, n. 3, p. 338–349, 2004.

GREVELINK, S.A.; LERNER, E.A. Leishmaniasis. **J Am Acad Dermatol**, v. 34, p. 257, 1996.

GRIMALDI Jr., G.; TESH, R.B. Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for future research. **Clin Microb Rev**, v. 6, p. 230–250, 1993.

HERMANSON, G. T. Tags and Probes. In: **Bioconjugate Techniques**. 2. ed. San Diego: Academic press, p. 1202, 2008.

HOMMEL, M. Enzymoimmunoassay in leishmaniasis. **T Roy Soc Trop Med H**, v. 70, p. 15-16, 1976.

HOMMEL, M. et al. The micro-ELISA technique in the serodiagnosis of visceral leishmaniasis. **Ann Trop Med Parasitol**, v. 72, n. 3, p.213-18, 1978.

HUANG, Q. *et al.* PEG as a spacer arm markedly increases the immunogenicity of meningococcal group Y polysaccharide conjugate vaccine. **J Control**, 2013. <http://dx.doi.org/10.1016/j.conrel.2013.03.008>

HONG, J. et al. Structural characterization of immunoglobulin G using time-dependent disulfide bond reduction. **Ann Biochem**, v. 384, n. 2, p. 368-70, 2008.

JAFFE, C.L.; ZALIS, M. Use of purified parasite proteins from *Leishmania donovani* for the rapid serodiagnosis of visceral leishmaniasis. **J Infect Dis**, v. 157, n. 6, p. 1212-1220, 1988.

JANSON J.C. **Protein Purification: Principles, High Resolution Methods, and Applications**. 3. ed. editado por John wiley and sons, mar. 2011

JENNINGS, H.J.; LUGOWSKI, C. Immunochemistry of groups A, B, and C meningococcal polysaccharide-tetanus toxoid conjugates, **J Immunol**, n. 127, v. 3, p.1011-8, 1981.

JOHNSON Jr, W. C. Secondary structure of proteins through circular dichroism spectroscopy. **Ann Rev Biophys Chem**, v. 17, p. 145-66, 1988.

KAR, K. Serodiagnosis of leishmaniasis. **Crit Rev Microbiol**, v. 21, n. 2, p. 123-152, 1995.

KOOLMAN, J.; RÖHM, K-H. **Color Atlas of Biochemistry**. 2 ed. New York: Thieme, 455 p., 2005.

LAINSON, R.; SHAW, J.J.; Evolution, classification and geographical distribution. In: Peters W, Killick-Kendrick R. **The Leishmaniasis in Biology and Medicine**. Vol. 1. London: Academic Press; p. 1-120, 1987.

LAINSON, R. et al. American visceral leishmaniasis: on the origin of *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi*. **T Roy Soc Trop Med H**, v. 81, n. 3, p. 517, 1987.

LAKOWICZJ.R. **Principles of Fluorescence Spectroscopy**. 4. ed. New York: Springer, 954p., 2006,

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of Bacteriophage T4. **Nature**, Inglaterra, v.15, n. 227, p. 680-685, 1970.

LEAL, C.R.B. **Métodos disponíveis e possíveis para o diagnóstico da leishmaniose visceral americana canina**. **BEPA**, v. 6, n. 69, p. 14-18, 2009.

LEVINSON, W. **Microbiologia Médica e Imunologia**. p. 426, 10ª edição, 2010.

LÓPEZ-REQUENA, A.; BURRONE, O.R.; GASPERE, M.C. Idiotypes as immunogens: facing the challenge of inducing Strong therapeutic immune responses against the variable region of immunoglobulins. **Front Oncol**–, v. 2, 159, 2012.

LIU, F.H. et al. Recovery and purification process development for monoclonal antibody production. **MAbs**, v. 2, n. 5, p. 480–499, 2010.

LIRA, R. A. et al. Canine visceral leishmaniosis: A comparative analysis of the EIE-leishmaniose-visceral-canina-Bio-Manguinhos and the IFI-leishmaniose-visceral-canina-Bio-Manguinhos kits. **Vet Parasitol**, v. 137, n. 1-2, p. 11–16, 2006.

MANCINI, G.; CARBONARA, A.O.; HERMANS, F.J. Immunochemical quantitation of antigens by a single radial immunodifusion. **Imunochemistry**, v. 2, n. 3, p. 235-254, 1965.

Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral. Brasília (DF); 2006.

http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/leishmaniose_visceral_reducao_letalidade.pdf.

Brasília DF – 2011/ acessado em 11/1/2013

MARZOCHI, M.C.A. Doenças infecto-parasitárias: Leishmanioses no Brasil: as leishmanioses tegumentares. **J Bras Med.**, v.63, p. 82-104, 1992.

MAURICIO, I.L.; STOHARD, J.R.; MILES, M.A. The strange case of *Leishmania chagasi*. **Parasitol Today**, v.16, n. 5, p. 188-9, 2000.

MEDEIROS, I.M.; NASCIMENTO, E.L.T.; HINRICHSEN, S.L. Leishmanioses (visceral e tegumentar). In: Hinrichsen SL. **DIP – Doenças Infecciosas e Parasitárias**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. p. 398-409, 2005.

MEDEIROS, M. Z. **Reagentes para Diagnóstico: Estratégias para a Produção e Desenvolvimento em Bio-Manguinhos**. 2004. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) - Escola Nacional de Saúde Pública, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2004.

Ministério da Saúde do Brasil. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral. Série A. Normas e Manuais Técnicos. Brasília, DF; 2003.

Ministério da Saúde do Brasil. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Sistema de informação de agravos de notificação e base populacional do IBGE. **Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral**. Brasília (DF); 2006.

Ministério da Saúde do Brasil. Secretária de Vigilância em Saúde. **Leishmaniose visceral: Guia de Vigilância Epidemiológica**. Brasília, 6ª edição; 2005.

MONTOYA, A.; CASTELL, J.V. Long term storage of peroxidase-labelled immunoglobulins for use in enzyme immunoassay. **J Immunol Methods**, v. 99, n. 1, p. 13-20, 1987.

MOREFIELD, G.L. A rational, systematic approach for the development of vaccine formulations. **AAPS J**, v. 13, n. 2, p. 191-200, 2011.

NAKANE, P.K.; KAWAOI, A. Peroxidase labeled antibody. A new method of conjugation. **J Histochem Cytochem**, v. 22, p.1084-91, 1974.

NIELSEN, K. Stability of freeze dried horseradish peroxidase conjugated monoclonal antibodies used in diagnostic serology. **J Immunoassay**, v.16, n. 2, p.183-97, 1995.

NOGUEIRA, Y.L.; ODORIZZI, R.M.; NAKAMURA, P.M.A comparison of the immune parameters of dogs infected with visceral leishmaniasis using Western blot and neutralization techniques. **Rev Inst Med Trop São Paulo**, v. 49, n. 6, p. 379-384, 2007.

PALATNICK DE SOUSA, C.B. et al. Impact of canine control on the epidemiology of canine and human visceral leishmaniasis in Brazil. **Am J Trop Med Hyg**, v. 65, n. 5, p. 510-517, 2001

PERCIANI, C.T. et al. Conjugation of polysaccharide 6B from *Streptococcus pneumoniae* with Pneumococcal Surface Protein A: PspA conformation and its effect on the immune response. **Clin Vaccine Immunol**, 2013. Disponível em: <http://cvi.asm.org/content/early/2013/03/29/00754-12.abstract> . Acesso em: 07 abr 2013.

PESSOA, S.B. **Parasitologia Médica**. 11. ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1982.

POCAI, E.A. et al. Leishmaniose visceral (calazar). Cinco casos em Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciênc Rural**, v. 28, n. 3, p. 501-505, 1998.

POP 1428. Precipitação de imunoglobulinas por sulfato de amônia a partir de soro de cabra. Rev 1, 2011.

.

POP 1435. Recebimento, titulação e estocagem de soros hiperimunes. Rev 0, 2010.

POP 1436. Preparo de inóculo para a produção de soro hiperimune. Rev 0, 2010.

POP 1831. Registro de produção de conjugado marcado com peroxidase para o desenvolvimento. Rev 2, 2010.

POP 2127. Protocolo de recebimento e titulação de soros hiperimunes Rev 1, 2011.

Portal da Saúde (<http://portalsaude.saude.gov.br/portalsaude/noticia/8178/162/paises-assinam-acordos-%3Cbr%3Epara-controle-de-doencas.html>) acesso em: 08/1/13

QUEIROZ Jr, E.M. **Validação do teste imunocromatográfico rápido Dual Path Platform para o diagnóstico da leishmaníase visceral canina**. 2011. 77f. Dissertação (Mestrado em

Ciências Veterinárias), Faculdade de Veterinária, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2011.

REY, L.O. Complexo “*Leishmania donovani*” e a Leishmaníase Visceral. In: **Parasitologia**. 3. ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan. Cap. 19, 253-266, 2001.

ROSS, R. Further Notes on *Leishmania*'s bodies. **British Medical Journal**, n. 11, p. 1401, 1903.

ROY, R.; KATZENELLENBOGEN, E.; JENNINGS, H.J. Improved procedures for the conjugation of oligosaccharides to protein by reductive amination. **Can. J. Biochem. Cell Biol**, v. 62, n. 5, p. 270-275, 1984.

SAHIN, E. et al. Comparative effects of pH and ionic strength on protein–protein interactions, unfolding, and aggregation for IgG1 Antibodies. **J Pharm Sci**, v. 99, n. 12, p. 4830-48, 2010.

SAMBROOK, J.E.F.; RUSSEL, D.W. Molecular Cloning. **A Laboratory Manual**. 3^aed, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press,; 2001.

SANTOS, N.S.O.; ROMANOS, M.T.V.; WIGG, M.D. Diagnóstico Laboratorial das Viroses In: **Introdução à Virologia Humana**. 1. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 254 p., 2002.

SANTOS, S.O. et al. Incrimination of *Lutzomyia cruzi* as a vector of American visceral leishmaniasis. **Med Vet Entomol**, v. 12, n. 3, p. 315-317, 1998.

SCHROEDER, H.W.; CAVACINI Jr, L. Structure and function of immunoglobulins. **J Allergy Clin Immunol**, v. 125, n. 2, p. 41-52, 2010.

SHÄGGER, H.; von JAGOW.G. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for separation of proteins in the range from 1 to 100 KDa. **Anal Biochem**, v. 166, n. 2, p. 368-379, 1987.

SHANNON L.M.; Kay, E. and Lew, J.Y. Peroxidase Isozymes from Horseradish Roots: I. ISOLATION AND PHYSICAL PROPERTIES. **The J. of Biol. Chem.**, v. 241, n. 9, p. 2166-2172, mai. 1966.

SHUETZ, A.J. et al. Stabilization of horseradish peroxidase (HRP) for the use in immunochemical sensors. In: **Environmental Sensing III**. International Society for Optics and Photonics, Munique, v. 3105, p. 332-40, mai.1997. [serial online]

SILVA, F. S. Patologia e patogênese da leishmaniose visceral canina. **Revista Trópica – Ciências Agrárias e Biológica**, v. 1, n. 1, p. 20-31, 2007.

SILVA, Jr. J.G. **Eletroforese de proteínas. Guia teórico e prático**. Rio de Janeiro: 1. ed. Interciência; 2001.

SILVA, Jr. J.G. **Cromatografia de Proteínas. Guia teórico e prático**. Rio de Janeiro: 1. ed. Interciência; 2004.

SILVA, K.E.R. *et al.* Modelos de Avaliação da Estabilidade de Fármacos e Medicamentos para a Indústria Farmacêutica. **Rev Ciênc Farm Básica Apl**, v. 30. n. 2, p. 129-135, 2009.

SIMONS, B.; KAPLAN, H.; HEFFORD, M.A. Novel cross-linked enzyme–antibody conjugates for Western blot and ELISA. **J Immunol Methods**,v. 31, n. 315 (1-2), p. 88–98, 2006.

SHEN, X. *et al.* Group B *Streptococcus* Capsular Polysaccharide-Cholera Toxin B Subunit Conjugate Vaccines Prepared by Different Methods for Intranasal Immunization. **American Society for Microbiology**. v. 69, n.1, p. 297-306, 2001.

SMITH, P.K. et al. Measurement of protein using Bicinchoninic Acid. **Anal Biochem**, v. 150, n. 1, p. 76-86, 1985.

SOUZA, C.S.F. **Modelo murino para infecção subcutânea com *Leishmania (Leishmania) chagasi*: Aspectos clínico, imunoparasitológico e histopatológico**. 2002. Tese (Doutorado

em *Biologia Parasitária*). Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2002.

STRICKLAND, E.H. et al. Peroxidase isoenzymes from horseradish roots: III. Circular Dicroism of isoenzymes and apoisoenzymes. **J Biol Chem**, v. 243, n. 13, p. 3560-3565, 1968.

TALMI-FRANK, D. et al. Kinetics and diagnostic and prognostic potential of quantitative Western blot analysis and antigen-specific enzyme-linked immunosorbent assay in experimental canine leishmaniasis. **Clin Vaccine Immunol**, v. 13, n. 2, p. 271-6, 2006.

TSANG, V.C.W; GREENE, R.M.; PILCHER, J.B. Optimization of the covalent conjugating procedure (NaIO_4) of horseradish peroxidase to antibodies for use in Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. **J Immunoassay**, v. 16, n. 4, p. 395-418, 1995.

VEITCH, N.C. Horseradish peroxidase: a modern view of a classic enzyme. **Phytochemistry**, v. 65, n. 3, p. 249–259, 2004.

WEBER, G.; DRICKAMER H.G. The effects of high pressure upon protein and other biomolecules. **Q Rev Biophysics**, v. 16, n. 1, p. 89-112, 1983.

WELINDER, K.G. Covalent structure of the glycoprotein horseradish peroxidase. **FEBS Lett.** n. 72, v. 1, p.19–23, 1976.

WELINDER, K.G. Superfamily of plant, fungal and bacterial peroxidases. **Curr Opin Struct Biol**, n. 2, p. 388–393, 1992a.

WELINDER, K.G.; GAJHEDE, M. Structure and evolution of peroxidases. In: Welinder, K.G., Rasmussen, S.K., Penel, C., Greppin, H. (Eds.), **Plant Peroxidases: Biochemistry and Physiology**. University of Geneva, Geneva, pp. 35–42, 1993.

World Health Organization. The world health report 2001. Geneva; 2001.

World Health Organization (WHO). **Essential leishmaniasis maps**. Disponível em: <http://www.who.int/leishmaniasis/leishmaniasis_maps/en/index1.html>. Acesso em: 04/11/2007.

World Health Organization. **Control of the leishmaniasis. Executive board. 118th Session**, Provisional agenda item 5.1; 2006. Disponível em: <www.emro.who.int/afghanistan/Media/PDF/Leishmaniasis_EB118_4.pdf>. Acesso em: 25/10/2007.

World Health Organization. **Tropical Diseases Research (TDR). Strategic Direction for Research: Leishmaniasis**. Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases; 2002.

World Health Organization. **Manual on Visceral Leishmaniasis Control**. Division of Control of Tropical Diseases, Geneva; 84, 1996.

WRIGHT, J.H. "Protozoa in a case of tropical ulcer ("Dheli sore")". **J. Med. Res**, n. 10, p. 472-482, 1903.

YU, S.T. et al. Comparative Circular Dichroism studies of an anti-fluorescein monoclonal antibody and its derivatives. **Biochemistry**, v. 31, n. 48, p. 12029-34, 1992.

YASUSHI, M.; MAKI FUJIHARA; IKEDA, I. **Spectroscopic Study on Structure of Horseradish Peroxidase in Water and Dimethyl Sulfoxide Mixture**. 2001. Published online 18 March 2002 in Wiley InterScience. Disponível em: www.interscience.wiley.com. Acesso em: 23 jan 2013.

ZAIA, D.A.M.; ZAIA, C.T.B.V.; LICHTIG, J. Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: vantagens e desvantagens dos métodos existentes. **Química Nova**, São Paulo, v. 21, n. 6, p. 787-793, nov/dez. 1998. Recebido em 23/7/97; aceito em 19/6/98

ZAMAN, V. **Atlas de parasitologia Clínica**. 285p.1979.

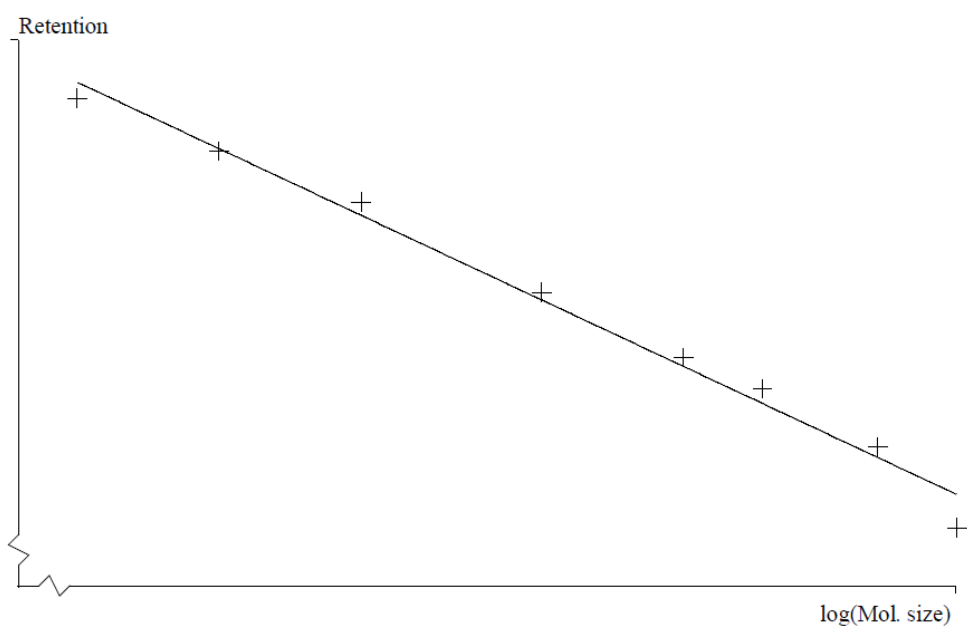
ZAVERUCHA, T.V. **Vacinação murina com frações subcelulares de Leishmania amazonensis sob modulação de Mycobacterium bovis BCG e ciclofosfamida**. 2005. Tese (Doutorado em Biologia Parasitária) Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2005.

**ANEXO A – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DE UM TESTE EIE PARA
DETERMINAÇÃO DA REPRODUTIBILIDADE E ESTABILIDADE DOS CONJUGADOS
1, 2 E 3 MANTIDO EM DIFERENTES TEMPERATURAS (4°C, 37°C e 50°C).**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
C 1 / 4°C	41	42	43	44	45	81	82	83	84	85	C+	C-
C 1 / 37°C	41	42	43	44	45	81	82	83	84	85	C+	C-
C 2 / 4°C	41	42	43	44	45	81	82	83	84	85	C+	C-
C 2 / 37°C	41	42	43	44	45	81	82	83	84	85	C+	C-
C 3 / 4°C	41	42	43	44	45	81	82	83	84	85	C+	C-
C 3 / 37°C	41	42	43	44	45	81	82	83	84	85	C+	C-
7	C+	C-	SS	C+	C-	SS	C+	C-	SS	ss C1 4°C	ss C2 4°C	ss C3 4°C
8	C+	C-	SS	C+	C-	SS	C+	C-	SS	ss C1 37°C	ss C2 37°C	ss C3 37°C
	C 1 / 50°C			C 2 / 50°C			C 3 / 50°C					

C+ = controle positivo, C- = controle negativo, SS = reação sem soro, C1 = conjugado 1, C2 = conjugado 2 e C3 = conjugado 3.

ANEXO B – CURVA DE CALIBRAÇÃO DA COLUNA PROTEIN PAK



Statistics

Model: Linear(log Mw)

$y = A * \log(x) + B$

$A = -2.94640E+000$

$B = 1.40190E+001$

Explained variance = 98.512 %

Correlation = -0.9936

Number of point(s) = 8

Retention ml	Molecular size kDa	Log(Molecular size)
5.21	669.000	2.83
6.38	440.000	2.64
7.21	240.000	2.38
7.66	158.000	2.20
8.60	75.000	1.88
9.89	29.000	1.46
10.63	13.700	1.14
11.39	6.500	0.81