

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
CURSO BIOTECNOLOGIA

Desenvolvimento de bioeletrodo conjugado a anticorpos policlonais IgY anti-BnSP-7 que detectam frações antigênicas de *Leishmania spp.*: Uma potencial ferramenta imunodiagnóstica para leishmaniose

Jean Carlos Teixeira Mendes

Orientadora: Profa. Dra. Veridiana de Melo Rodrigues Ávila

Co-orientadora: Dra. Isabela Pacheco Borges

Uberlândia – MG

Fevereiro – 2020

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
CURSO BIOTECNOLOGIA

Desenvolvimento de bioeletrodo conjugado a anticorpos policlonais IgY anti-BnSP-7 que detectam frações antigênicas de *Leishmania spp.*: Uma potencial ferramenta imunodiagnóstica para leishmaniose

Monografia apresentada à
Coordenação do Curso de Biotecnologia, da
Universidade Federal de Uberlândia, para
obtenção do grau de Bacharel em
Biotecnologia.

Homologado pela coordenação do
Curso de Biotecnologia em __/__/__

Prof. Dr Edgar Silveira Campos

Uberlândia – MG

Fevereiro – 2020

Dedicatória

Dedico esse trabalho de conclusão de curso a minha irmã e aos meus pais, que são as pessoas que mais amo no mundo e sempre lutaram para me proporcionar tudo que conquistei até hoje, sem vocês nada disso seria possível. Vocês foram fundamentais para meu crescimento enquanto estudante, amo muito vocês e espero que um dia eu consiga retribuir todo esse amor e dedicação que vocês tiveram por mim durante todos esses anos.

E também a minha amiga Angélica, que esteve presente em minha vida desde o pré-vestibular e sempre me motivou a correr atrás dos meus sonhos. Obrigado por me receber em sua casa quando me mudei pra Uberlândia, e por sempre estar presente me dando suporte em qualquer tipo de situação ou problema que enfrentei, te amo muito.

A minha coorientadora Dr^a Isabela Pacheco Borges, que é uma pessoa que eu tenho grande admiração e respeito. Obrigado por sempre me responder e me ajudar nos momentos de desespero e por ter me ensinado praticamente tudo que eu aprendi até o momento em técnicas de laboratório, este trabalho só existe pois é uma continuação de um dos seus estudos e eu tenho muita gratidão por tudo que você me ajudou e ensinou.

Agradecimentos

Primeiramente gostaria de agradecer à Prof.^a Dr.^a Veridiana de Melo Rodrigues Ávila por me aceitar como orientando. Mesmo sem conhecer sua linha de pesquisa, eu já sabia que queria você como orientadora desde a primeira vez que nos encontramos na aula de Bioquímica 2, pois até momento eu nunca tinha presenciado uma aula sendo executada com tamanha perfeição e amor.

Professoras que tem o talento de despertar a curiosidade e o interesse de toda turma por temas complexos, e explica-los com tanta facilidade são raridade, e isso me dá motivação para que um dia eu possa ser tão bom quanto você. Obrigado por sempre me apoiar e aceitar minhas propostas de fazer pesquisas fora da sua área de atuação, e por acreditar na minha capacidade mesmo quando nem eu acreditava, saiba que sempre vou ter orgulho e gratidão por ter tido você como minha orientadora.

A Profa. Dr.^a Ana Graci Brito Madurro, que conheci nas aulas de Nanobiotecnologia e Biossensores. Confesso que a princípio fiquei assustado por conta do nome complexo da disciplina, mas com o decorrer das aulas consegui visualizar que se tratava de uma área que se conectava com a química, bioquímica, genética, imunologia e diversas áreas que eu amo. Assim como a Veri, tenho muita admiração por você e fico muito feliz que este trabalho envolva a linha de pesquisa de vocês duas, muito obrigado por permitir que eu trabalhasse no LAFIP/BIOSSENS.

Gostaria de agradecer também aos meus novos amigos do LAFIP/BIOSSENS: José, Pedro, Anna Clara, Dayane, Mônica e Jéssica que sempre estiveram de prontidão para me ajudar e sanar duvidas, e me receberam de braços abertos neste novo ambiente de trabalho.

Minha amiga Ana Flávia, parceira de todos os trabalhos e seminários durante a graduação, sua amizade foi fundamental para enfrentar todos esses anos de graduação.

E também meus amigos que sempre estiveram presentes me dando apoio nos momentos de dificuldade e felicidade: Anderson, Breno, Gabriel, Paula, Vanessa, Marcos Paulo, Felipe, Agenor, Lucas, Ismail.

E também à funcionária do LABITOX Marina, por me ensinar a preparar soluções e por sempre estar disponível para auxiliar.

Lista de figuras

- Figura 1** – Estado mundial de endemicidade da leishmaniose cutânea (LC) no ano de 2018.
- Figura 2** – Estado mundial de endemicidade da leishmaniose visceral (LV) no ano de 2018.
- Figura 3** – Ciclo de vida de *Leishmania spp.*
- Figura 4** – Representação esquemática da hidrólise específica da ligação 2-acil-éster de um fosfolípido.
- Figura 5** – Representação em *Cartoon* da estrutura tridimensional da BnSP-7.
- Figura 6** – Estrutura das imunoglobulinas IgG e IgY.
- Figura 7** – Esquema representativo de um biossensor/imunossensor.
- Figura 8** – Diferenças entre Grafeno, OG e OG reduzido.
- Figura 9** – Representação da construção do eletrodo de trabalho.
- Figura 10** – Esquema da célula eletroquímica de 3 compartimentos utilizada neste estudo.
- Figura 11** – Esquema da incorporação de OG eletroquimicamente reduzido (autoria própria).
- Figura 12** – Esquema da polimerização de tiramina (autoria própria).
- Figura 13** – Esquema da imobilização dos anticorpos (autoria própria).
- Figura 14** – Índice ELISA das amostras de extrato celular bruto das diferentes linhagens de *Leishmania* nas velocidades de centrifugação normal (N) (4000 x g) e diferenciada (D) (10000 x g).
- Figura 15** – Voltamogramas da superfície do eletrodo
- Figura 16** – Histograma dos dados de pico de corrente

Lista de abreviaturas

- adPLA₂** – Fosfolipase A₂ específica do tecido adiposo.
- Asp** – Aspartato.
- CH** – Domínios constantes da cadeia pesada.
- CL** – Domínio constante da cadeia leve.
- cPLA₂** – Fosfolipase A₂ citosólica.
- Cys** – Cisteína
- CU** – Domínios constantes da cadeia pesada épsilon.
- DO** – Densidade óptica
- Fab** – Fragmento de ligação ao antígeno.
- Fc** – Fragmento cristalizável.
- Gly** – Glicina.
- His** – Histidina.
- IE** – Índice ELISA.
- Ig** – Imunoglobulina.
- IgG** – Imunoglobulina G.
- IgY** – Imunoglobulina Y.
- IgY-** – Imunosensor imobilizado com anticorpos IgY imunizados com PBS.
- IgY+** – Imunosensor imobilizado com os anticorpos anti-BnSP-7.
- IgY+L** – Imunosensor com a sonda positiva e extrato bruto de *L. (L.) infantum*.
- IgY+T** – Imunosensor de sonda positiva com BnSP-7.
- IgY-L** – Imunosensor com a sonda negativa e extrato bruto de *L. (L.) infantum*.
- IgY-T** – Imunosensor com a sonda negativa e BnSP-7.
- iPLA₂** – Fosfolipase A₂ independente de cálcio.
- LC** – Leishmaniose cutânea.
- Leu** – Leucina.
- LLA** – *Leishmania (Leishmania) amazonensis*.
- LLI** – *Leishmania (Leishmania) infantum*.
- LPLA₂** – Fosfolipase A₂ Lisossomal.
- LTA** – Leishmaniose tegumentar americana.

LV – Leishmaniose visceral.

LVA – Leishmaniose visceral americana.

LVB – *Leishmania (Viannia) braziliensis*.

Lys – Lisina.

MDis – Domínio hidrofóbico de desestabilização da membrana.

MDoS – Domínio catiônico de ancoragem na membrana plasmática.

NC – Bioeletrodo de grafite com o nanocompósito

OG – Óxido de grafeno

OGra – Óxido de grafite

PAF-AH – Fosfolipase A₂ acetilhidrolases do fator ativador de plaquetas.

PBS – Solução salina tamponada com fosfato.

PBS-T – Solução salina tamponada com fosfato e Tween.

PBS-T-M – Solução salina tamponada com fosfato, Tween e leite em pó sem gordura.

Phe – Fenilalanina.

PLA₂ – Fosfolipase A₂.

Ser – Serina.

sPLA₂ – Fosfolipase A₂ secretadas.

VH – Domínio variável da cadeia pesada.

VL – Domínio variável da cadeia leve.

Sumário

1.0 RESUMO.....	10
2.0 INTRODUÇÃO	11
2.1 Leishmaniose:	11
2.1.1 Classificação e epidemiologia.....	11
2.1.2 Ciclo de vida.....	13
2.2 Fosfolipases A ₂ : Características químicas, funções e sua relação com parasitoses...	14
2.3 Imunoglobulina Y anti-BnSP-7: uma molécula com propriedades teranósticas.....	18
2.4 Bioeletrodo: características e aplicações.....	21
3.0 OBJETIVOS.....	23
3.1 Objetivos Específicos	23
4.0 MATERIAL E MÉTODOS	23
4.1. Obtenção da toxina e anticorpo	23
4.2. Cultivo de parasitos	24
4.3 Extração de proteínas.....	24
4.4 Dosagem de proteínas	25
4.5 Determinação do maior Índice ELISA nos extratos de <i>Leishmania spp.</i>	25
4.6 Construção do bioeletrodo e medidas eletroquímicas.....	26
4.6.1 Construção do eletrodo de grafite utilizando célula eletroquímica de 3 compartimentos	26
4.6.2 Incorporação do oxido de grafeno reduzido eletroquimicamente	27
4.6.3 Polimerização de tiramina na superfície do eletrodo	28
4.6.3 Imobilização dos anticorpos.....	29
4.7 Detecção de BnSP-7 e extrato de <i>L. (L.) infantum</i> pelo bioeletrodo.....	30
4.8 Análises estatísticas	31
5.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
5.1 ELISA demonstrou maior IE para o extrato bruto de <i>L. (L.) infantum</i>	31
5.2 O bioeletrodo foi efetivo em detectar alvos em extrato bruto de <i>L. (L.) infantum</i>	34

6.0 Conclusão.....	36
8.0 REFERÊNCIAS	37

1.0 RESUMO

Fosfolipases A2 (PLA₂) são enzimas encontradas em muitos organismos e sua presença em parasitos tem sido relacionada com seu potencial de virulência e pode ser um alvo importante para estudos de diagnóstico de doenças parasitárias. Assim, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o maior índice ELISA utilizando o anticorpos policlonais IgY anti-BnSP-7, obtidos da imunização de galinhas com uma PLA₂ da peçonha de *Bothrops pauloensis*, e anticorpos policlonais IgY PBS obtidos da imunização de galinhas com PBS (controle negativo) contra extratos proteicos de *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) infantum* com a finalidade de construir um bioeletrodo. Os resultados do ensaio de ELISA demonstraram que os anticorpos policlonais IgY anti-BnSP7 apresentaram Índice ELISA (IE) maior que 1,2 para todos os extratos proteicos de *Leishmania* avaliados, o que não foi observado quando se utilizou os anticorpos policlonais IgY PBS. O extrato de *L. (L.) infantum* foi utilizado como alvo na produção de um bioeletrodo por apresentar o maior IE. No bioeletrodo, foi observado que na ausência de biomoléculas, ou seja, apenas no eletrodo de grafite com o nanocompósito (NC), a corrente do pico de oxidação resultante é maior (1129,4 μ A), porém ao imobilizar os anticorpos a corrente reduz aproximadamente 176 μ A para sonda negativa (NC/IgY-) e 193,3 μ A para a sonda positiva (NC/IgY+). Além disso, o bioeletrodo contendo o anticorpo IgY anti-BnSP7 foi eficaz em reconhecer o extrato proteico obtido de *Leishmania infantum*, diminuindo a corrente elétrica para aproximadamente 623 μ A ao contrário dos anticorpos IgY-PBS que não diminuíram a corrente elétrica assim como os bioeletrodos que contém apenas sonda. Os resultados oriundos deste trabalho demonstram a capacidade dos anticorpos IgY anti-BnSP-7 em reconhecer proteínas de *Leishmania* e sua especificidade quando comparados com anticorpos policlonais IgY PBS. A utilização de anticorpos anti-PLA₂ pode constituir-se numa ferramenta importante para o diagnóstico de doenças parasitárias por meio da utilização de bioeletrodos. No entanto, novos estudos devem ser conduzidos na tentativa de otimizar a construção dos biossensores como por exemplo, com a elaboração de uma curva de calibração, ensaios de estabilidade e regeneração do bioeletrodo.

Palavras-chave: Anticorpo policlonal IgY; Bioeletrodo; Leishmania; Fosfolipase A2

2.0 INTRODUÇÃO

2.1 Leishmaniose:

2.1.1 Classificação e epidemiologia

As leishmanioses são doenças causadas por protozoários do gênero *Leishmania*, e sua transmissão é feita por insetos dos gêneros *Phlebotomus* no velho mundo, e *Lutzomyia* no novo mundo, que foram previamente infectados pelo parasito. Além disso, a enfermidade acomete seres humanos, animais domésticos e selvagens (DESJEUX, 2004; WHO, 2016). Essa protozoose se enquadra como uma endemia tropical emergente negligenciada, que afeta principalmente populações pobres e de grande desigualdade social, e está entre as seis mais importantes doenças infecciosas parasitárias do mundo (ALVAR et al., 2012; WHO, 2020).

A leishmaniose tem três formas principais: (1) Leishmaniose cutânea (LC): gera ferimentos na pele e ulcerações; (2) Leishmaniose mucosa: afeta a mucosa nasal e outras, ocasionando mutilações em casos mais graves; (3) Leishmaniose visceral (LV): atinge o baço, fígado, medula óssea e linfonodos, ocasionando febre e anemia, podendo levar a morte se não for tratada (WHO, 2020). No Continente Americano é atribuída a seguinte denominação: leishmaniose tegumentar americana (LTA) e leishmaniose visceral americana (LVA) (PONTES, 2008). A diferenciação entre leishmaniose cutânea e visceral é determinada pela espécie do parasito. O gênero *Leishmania*, compreende cerca de 30 espécies catalogadas até o momento, das quais 21 são patogênicas aos humanos (DANTAS-TORRES, 2006; LESSA et al., 2007; WHO, 2016). No Brasil, a forma cutânea da doença, é causada principalmente por seis espécies que pertencem ao subgênero *Viannia* e uma ao subgênero *Leishmania*, sendo as principais *L. (Viannia) braziliensis*, *L. (Viannia) guyanensis* e *L. (Leishmania) amazonensis* (GUEDES et al., 2008; COSTA et al., 2011).

A Organização Mundial de Saúde (2018), estima que aproximadamente 12 milhões de pessoas sejam afetadas anualmente por leishmanioses. As figuras 1 e 2 apresentam o quadro mundial de endemicidade da LC e LV. Estima-se que mais de 5000 e 1000 novos casos sejam reportados para a LC e LV respectivamente. Brasil, Etiópia, Índia, Quênia, Somália, Sudão do Sul e Sudão apresentam os maiores índices mundiais de LC e LV (WHO, 2016).

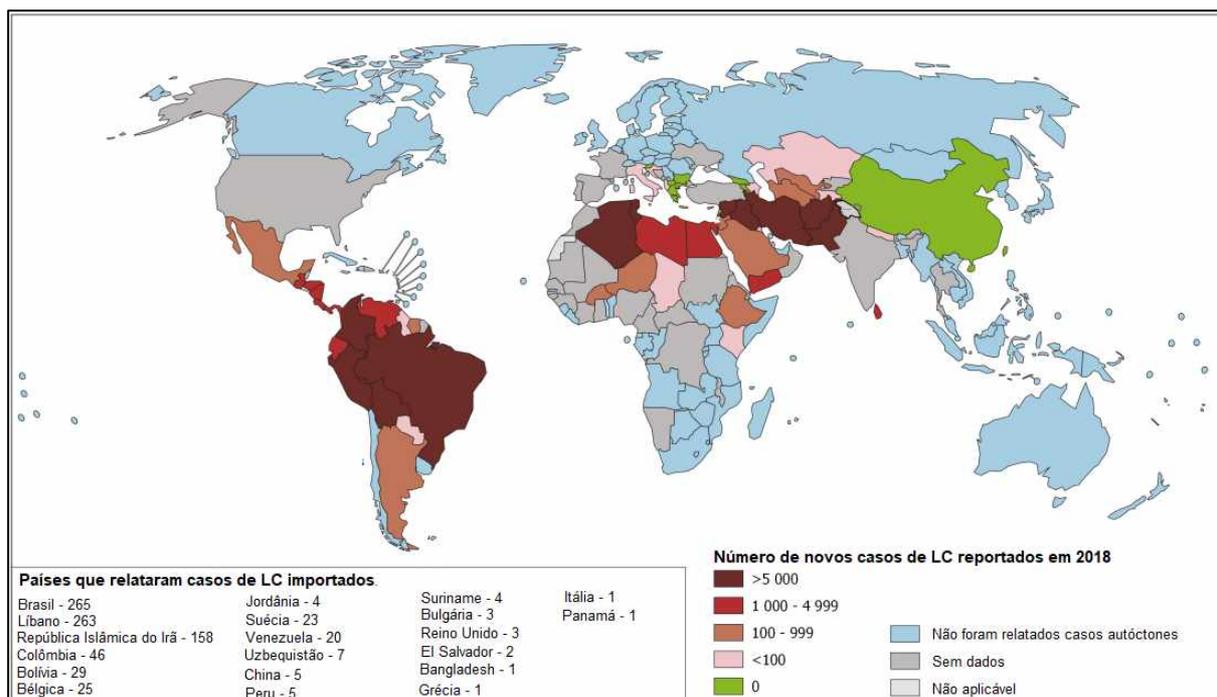


FIGURA 1: Estado mundial de endemicidade da leishmaniose cutânea (LC) no ano de 2018.

Fonte: Adaptado de (WHO, 2020)

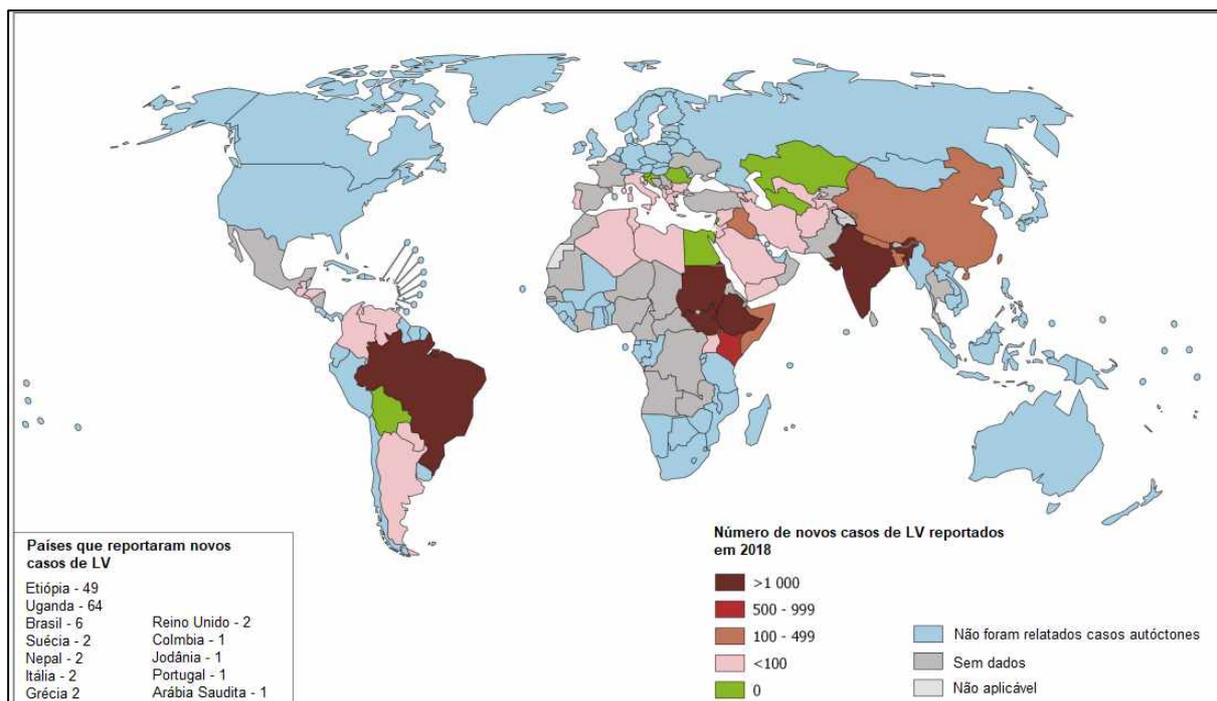


FIGURA 2: Estado mundial de endemicidade da leishmaniose visceral (LV) no ano de 2018.

Fonte: Adaptado de (WHO, 2020)

2.1.2 Ciclo de vida

Os parasitas do gênero *Leishmania*, tem um ciclo de vida heteroxeno, com duas formas morfológicas, a forma amastigota é encontrada em células fagocíticas, como macrófagos do hospedeiro vertebrado, já a forma promastigota é encontrada no intestino do inseto vetor (ALEXANDER et al., 1999).

O ciclo de vida em humanos se inicia quando fêmeas de flebotomíneos, inseto vetor, infectadas com o parasito injetam formas promastigotas no organismo humano através do repasto sanguíneo (Figura 3).

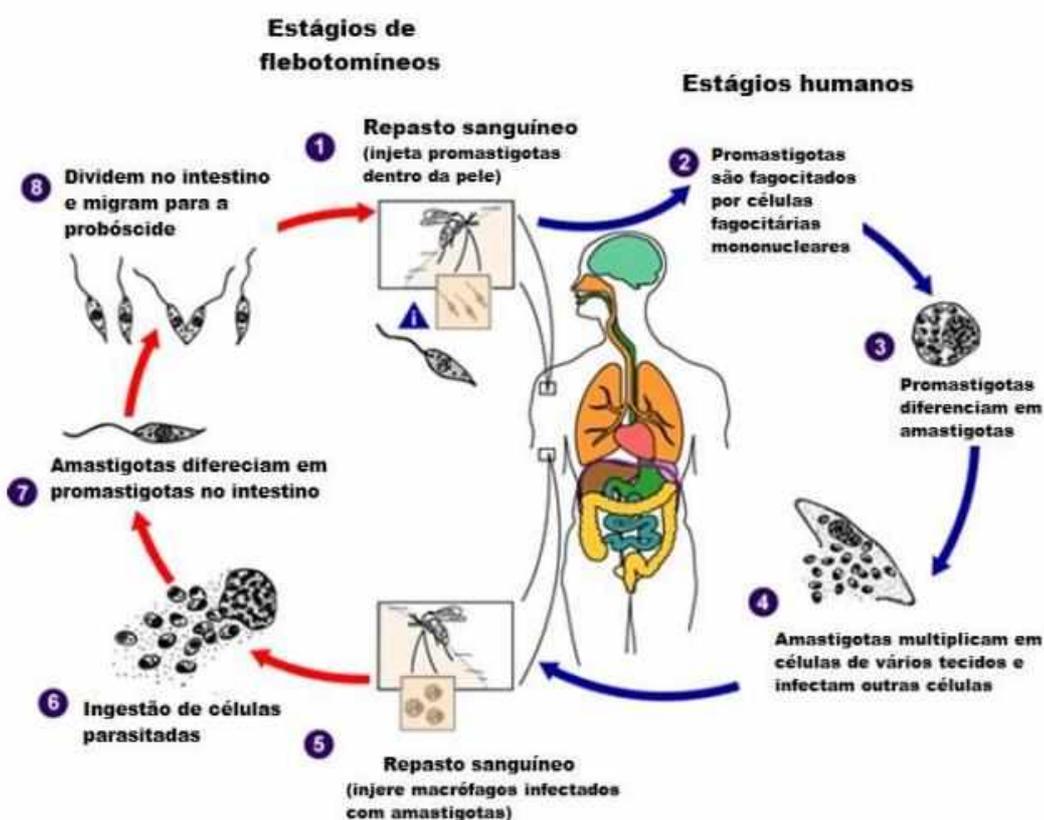


FIGURA 3: Ciclo de vida de *Leishmania* spp. (1) - A leishmaniose é transmitida pela picada de flebotomíneos infectados. Os flebotomíneos injetam promastigotas de sua probóscide durante o repasto sanguíneo; (2) - Promastigotas que atingem a ferida são fagocitadas por macrófagos e outros tipos de células fagocíticas mononucleares; (3) - Os promastigotas transformam-se nestas células em amastigotas, (4) que se multiplicam por divisão simples e prosseguem para infectar outras células fagocíticas mononucleares; (5 e 6) - Os flebotomíneos são infectados pela ingestão de células infectadas durante o repasto sanguíneo; (7) - Nos flebotomíneos, os amastigotas se transformam em promastigotas, desenvolvem-se no intestino; (8) - No intestino posterior (subgênero *Viannia*) ou no intestino médio (subgênero *Leishmania*) se dividem e migram para a probóscide. Fonte: Adaptado de CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION 2019.

A seguir, os promastigotas são fagocitados por macrófagos do hospedeiro, e quando estão no interior destas células, o parasito se modifica para sua forma amastigota, que se reproduz por divisão binária. A multiplicação ocorre continuamente até ocasionar a ruptura do macrófago. Após a lise do macrófago, os amastigotas liberados infectam outros fagócitos. O mosquito vetor pode ser infectado no momento do repasto sanguíneo com o hospedeiro humano contendo células parasitadas. No intestino do mosquito os amastigotas mudam para a forma promastigota, e migram para a probóscide do inseto vetor, concluindo o ciclo quando o inseto vetor infectado se alimenta de sangue e contamina o hospedeiro (BATES et al., 2004).

2.2 Fosfolipases A₂: Características químicas, funções e sua relação com parasitoses

As fosfolipases são um grupo diverso de enzimas com larga distribuição entre os organismos vivos capazes de mediar várias funções celulares, incluindo síntese ou perturbação da membrana, bem como regulação da sinalização ou respostas inflamatórias. Essas enzimas lipolíticas são classificadas nos grupos A (A₁ e A₂), B, C e D correspondentes às diferentes locais de hidrólise de fosfolipídeos (DENNIS et al., 2011).

As fosfolipases A₂ (PLA₂, E.C. 3.1.1.4) são encontradas em diversos organismos tais como mamíferos, parasitos, peçonhas de artrópodes, serpentes, dentre outros (HIGUCHI et al., 2007; PASSERO et al., 2008; ZOUARI-KESSENTINI et al., 2009; GARCIA-DENEGRI et al., 2010). PLA₂ desempenham papéis importantes no metabolismo de lipídios, tendo como principais substratos os fosfolipídeos de membrana plasmática. A atividade enzimática das PLA₂ foi primeiramente elucidada em 1890, utilizando peçonhas de serpentes (STEPHENS et al., 1898). Quando são ativadas a nível celular, as PLA₂ catalisam a hidrólise da ligação éster preferencialmente na posição sn-2 dos fosfolipídios de membrana (**Figura 4**), sendo que essa região pode conter o ácido araquidônico ou outros ácidos graxos poliinsaturados (KINI et al., 2003; HIGUCHI et al., 2007; BUCZYNSKI et al., 2009). Os produtos de sua reação, o ácido araquidônico e lisofosfolipídeos podem exercer uma série de efeitos biológicos.

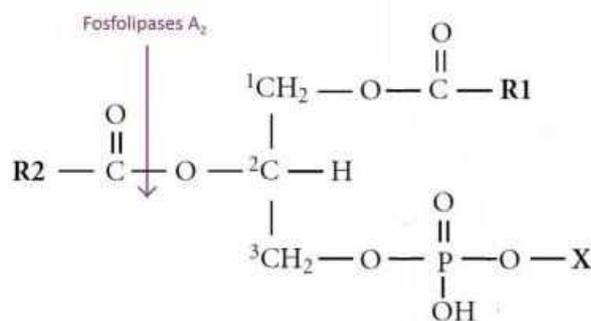


FIGURA 4: Representação esquemática da hidrólise específica da ligação 2-acil-éster de um fosfolípido. A seta indica a ligação química alvo de clivagem hidrolítica da PLA₂. Fonte: Adaptado de BELAUNZARÁN et al., 2011.

O ácido araquidônico quando liberado é utilizado pelas cicloxigenases e lipoxigenases para catalisar a produção de eicosanoides como leucotrienos, prostaglandinas e tromboxanos (FUNK, 2001). Os eicosanoides atuam através da ligação a receptores acoplados à proteína G específicos. Após interagir com o receptor, os eicosanoides desempenham um papel em uma gama de processos fisiológicos e patológicos, como regulação do sono, respostas imunes, inflamação e percepção da dor (TSUBOI et al., 2002). Os lisofosfolídeos também estão associados no processo de sinalização celular e na remodelagem dos fosfolídeos da membrana plasmática. Além disso, podem atuar como precursores de mediadores lipídicos, tais como ácido lisofosfatídico – envolvido na sobrevivência, proliferação e migração celular. (SIX; DENNIS, 2000; SCHALOSKE; DENNIS, 2006).

As PLA₂ são classificadas em seis tipos principais: PLA₂ secretadas (sPLA₂), PLA₂ citosólicas (cPLA₂), PLA₂ independentes de Ca²⁺ (iPLA₂), PLA₂ acetilhidrolases do fator ativador de plaquetas (PAF-AH), PLA₂ lisossomais (LPLA₂) e PLA₂ específica do tecido adiposo (AdPLA) (SCHALOSKE ; DENNIS, 2006; DENNIS et al., 2011) (**Tabela 1**). Os seis tipos principais foram subdivididos em dezesseis grupos de acordo com a origem, massa molecular relativa, quantidade de ligações dissulfeto e resíduo presente no sítio catalítico, sendo que as PLA₂ das peçonhas de serpentes estão contidas nos grupos GI e GII (**Tabela 1**) (DENNIS et al., 2011).

Tipo	Grupo	Massa molecular (kDa)	Resíduo catalítico
sPLA ₂	GI	13-15	His/Asp
	GII	13-17	
	GIII	15-18	
	GV	14	
	GIX	14	
	GX	14	
	GXI	12-13	
	GXII	19	
	GXIII	<10	
	GXIV	13-19	
cPLA ₂	GIV	60-114	Ser/Asp
iPLA ₂	GVI	84-90	Ser/Asp
PAF-AH	GVII, GVIII	40-45 e 26-40	Ser/His/Asp
LPLA ₂	GXVI	45	Ser/His/Asp
AdPLA	GXVI	18	His/Cys

Tabela 1: Superfamília das fosfolipases A₂. Tabela adaptada de DENNIS et al., 2011.

O grupo I inclui as PLA₂ presentes na família Elapidae e grupo II as das famílias Viperidae e Crotalidae (DENNIS, 1994). PLA₂ isoladas dessas peçonhas que pertencem ao grupo II são ainda subdivididas em dois subgrupos principais, as PLA₂s Asp49 pertencem ao subgrupo I, e exibem um resíduo Asp na posição 49, com elevada atividade catalítica sobre substratos artificiais e naturais, já as PLA₂s Lys49 estão contidas no subgrupo II, e possuem um resíduo Lys na posição 49, com baixa ou nenhuma atividade catalítica (ARNI ; WARD, 1996; OWNBY et al., 1999; SOARES et al., 2004).

Quanto ao mecanismo de ação, nas PLA₂s-Asp49 o resíduo de aminoácido, ácido aspártico, na posição 49 é fundamental para ocorrência da atividade catalítica, pois este resíduo coordena o íon Ca²⁺, que impulsiona o reconhecimento do substrato no sítio ativo, polariza a ligação éster cindível e estabiliza o estado de transição (PETAN et al., 2007; SCOTT et al., 1990). Já o mecanismo de ação das PLA₂s-Lys49 se deve à presença de dois domínios conservados nas Lys49, o domínio catiônico de ancoragem na membrana plasmática (MDoS), constituído por resíduos C-terminais com resíduos conservados de Lys115 e Arg118, estabilizado por resíduos catiônicos como Lys20, Lys80, Lys122 e Lys127, e o domínio hidrofóbico de desestabilização da membrana (MDiS), composto por resíduos de Leu e Phe. Este mecanismo ocorre com a indução do alinhamento de MDoS e MDiS dos monômeros com

a presença de um ligante no canal hidrofóbico, aumentando a eficácia do processo de ancoragem (DOS SANTOS et al., 2009) e ruptura da membrana (KYTE; DOOLITTLE, 1982; WIMLEY; WHITE, 2011; FERNANDES et al., 2013).

A PLA₂ BnSP-7, foi a primeira PLA₂ purificada da peçonha de *Bothrops pauloensis* e é uma Lys 49, portanto, cataliticamente inativa, com massa molecular de cerca de 14 kDa, e ponto isoelétrico de 8,8. A BnSP-7 é uma proteína dimérica (**Figura 5**) rica em resíduos básicos e hidrofóbicos e a sua estrutura tridimensional apresenta três grandes α -hélices e duas folhas- β anti-paralelas, ligadas por sete pontes dissulfeto e também um loop de ligação ao cálcio (DENNIS et al., 2011; CORRÊA, 2007; DE LIMA et al., 2017).

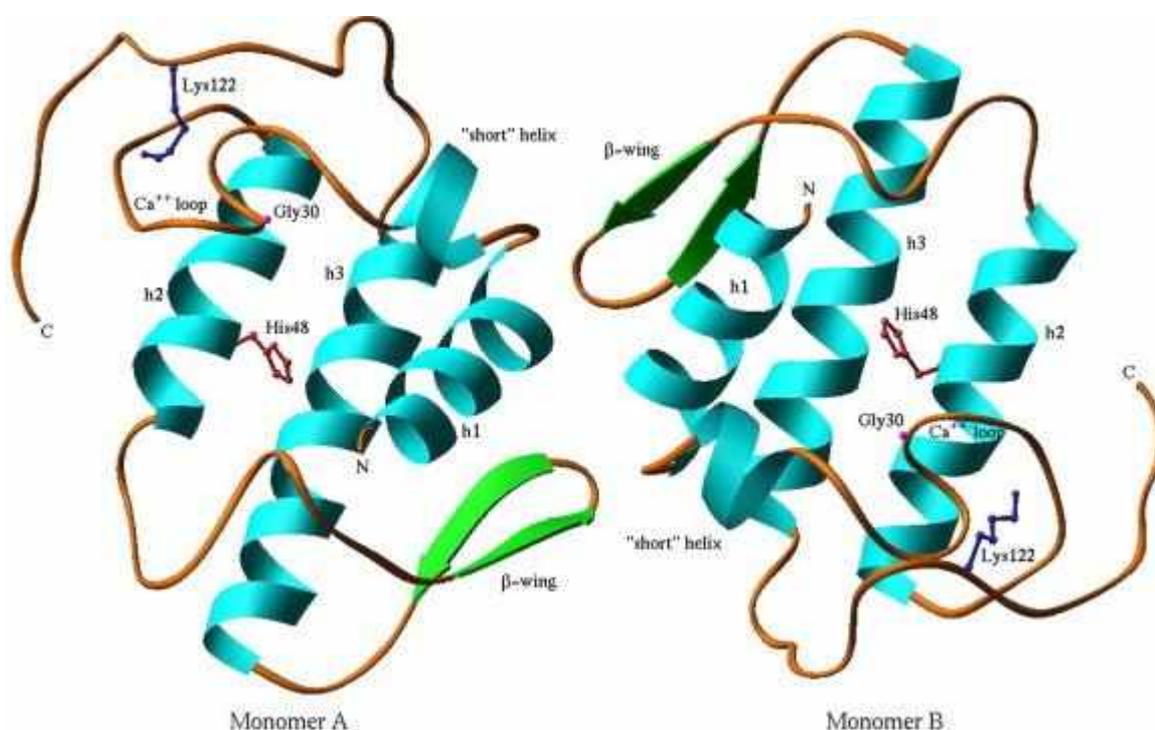


FIGURA 5: Representação em *Cartoon* da estrutura tridimensional da BnSP-7. As α -Hélices estão representadas em azul e as folhas β na cor verde por setas. Gly30, His48 e Lys122 do sitio ativo estão representados em modelo de bola-bastão Fonte: MAGRO et al., 2003

Além disso, a BnSP-7 contém resíduos de Gly30, Gly33, His48, Asp 99 conservados em sua estrutura na região N-terminal (RODRIGUES et al., 1998; SOARES et al., 2000; MAGRO et al., 2003). A região C-terminal, contém um segmento conservado na maioria das PLA₂s Lys49, com os resíduos 115-129 apresentando aminoácidos catiônicos e hidrofóbicos responsáveis por causar danos as membranas celulares. Os resíduos catiônicos proporcionam a interação eletrostática com grupos aniônicos em fosfolipídios da membrana, possivelmente

carregados negativamente (LOMONTE et al., 2003). Já os resíduos hidrofóbicos, especialmente os aromáticos, podem permitir a interação da enzima com a bicamada fosfolipídica, favorecendo assim sua penetração, o que resulta na sua desestabilização (NÚÑEZ et al., 2001). Esta atividade é diretamente relacionada com a forma dimérica das PLA₂-Lys49 em solução (FRANCIS et al., 1991; DA SILVA GIOTTO et al., 1998; OLIVEIRA et al., 2001).

A BnSP-7 foi amplamente estudada por nosso grupo de pesquisa, e os estudos demonstraram que apesar da ausência de atividade catalítica, ela é capaz de induzir necrose em fibras musculares, edema, liberação de creatina quinase do músculo gastrocnêmico de camundongos, bem como atividade bactericida sobre *Escherichia coli* (RODRIGUES et al., 1998; SOARES et al., 2000; MAGRO et al., 2003, OLIVEIRA et al., 2009), e também apresenta atividade antiparasitária contra *Leishmania amazonensis* (NUNES et al., 2013) e *Toxoplasma gondii* (BORGES et al., 2016), dentre outras atividades (RODRIGUES et al., 2015). Ainda no contexto de funções de PLA₂, é sabido que parasitas do gênero *Leishmania* são capazes de remodelar lipídios de membrana utilizando fosfolipases A₂ com a finalidade de invadir células hospedeiras. A hidrólise de lipídeos da membrana celular promove a perda de sua estrutura, prejudicando assim a sua permeabilidade seletiva, dessa forma, essas enzimas são de suma importância para a atividade metabólica e virulência do parasito (BELAUNZARÁN et al., 2010; BELAUNZARÁN et al., 2011; PAWLOWIC et al., 2012). Outros estudos sugerem que a atividade da PLA₂ no sobrenadante de cultura de promastigotas de *L. (L.) amazonensis* pode ser um dos fatores de progressão para a leishmaniose cutânea (PASSERO et al., 2008).

Portanto, é de suma importância o desenvolvimento de moléculas capazes de inibir e detectar a atividade dessas enzimas, com a finalidade de proporcionar novas alternativas para o tratamento e diagnóstico de parasitoses. Dessa forma, Borges et al., 2018 demonstrou a atividade antiparasitária de anticorpos policlonais IgY anti-Bnsp-7, no qual a reatividade cruzada do anticorpo para epítomos conservados em PLA conseguiu opsonizar uma possível fosfolipase em *Leishmania amazonensis* na forma promastigota e impedir a atividade parasitária.

2.3 Imunoglobulina Y anti-BnSP-7: uma molécula com propriedades teranósticas

A imunoglobulina (Ig) Y e os anticorpos em geral possuem duas cadeias leves e duas cadeias pesadas idênticas (ABBAS et al., 2010; KINDT et al., 2007). Cada cadeia é constituída de duas regiões distintas: uma sequência variável na região N-terminal e uma sequência

constante na região C-terminal. A estrutura das cadeias é mantida por interações covalentes, pontes dissulfetos e outras interações que proporcionam a formação de domínios que constituem as diferentes regiões dos anticorpos, Fab (do inglês, *Fragment antigen binding*) e Fc (*Fragment, Crystallizable*) ambas ligadas por uma região flexível (região de dobradiça) (ABBAS et al., 2010).

A imunoglobulina é chamada de IgY porque está presente na gema do ovo (IgY, Y = *yolk*, gema em inglês), e o termo IgY foi criado por Leslie e Clem (1969), ao enfatizar as diferenças entre IgY e IgG, como diferenças antigênicas e do tamanho maior da cadeia pesada de IgY, entretanto, a ideia não foi aceita de imediato e grande parte da literatura continuou chamando IgY de IgG de galinha (LESLIE e CLEM, 1969; SCHADE et al., 2005; CHALGHOUMI et al., 2009; ZHANG et al., 2017). Em relação as diferenças estruturais entre IgY e IgG, a IgY tem as seguintes características: duas cadeias leves (L), com 25 kDa e duas pesadas (H), cada uma com massa molecular de 67 a 70 kDa. As cadeias leves possuem uma região constante (CL) e uma região variável (VL). Já a IgG é constituída de três regiões constantes nas cadeias pesadas (CH1, CH2 e CH3), além disso, na IgY a cadeia pesada epsilon (ν) possui um domínio variável e quatro domínios constantes (C ν 1; C ν 2; C ν 3 e C ν 4) (KOVACS-NOLAN e MINE, 2012). A região do fragmento (Fab) da IgY é semelhante a IgG, possui uma cadeia leve completa com seu domínio variável e o domínio pesado, associados aos domínios variável e o C ν 1 da cadeia pesada, enquanto o fragmento cristalizável (Fc) da IgY é composto pelos três domínios constantes restantes na cadeia pesada (C ν 2, C ν 3 e C ν 4) (SCHADE, 2005). Um outro domínio constante, com as cadeias de carboidratos correspondentes, dá a IgY uma massa molecular mais alta (180 kDa) em comparação com IgG (150 kDa) (MICHAEL et al., 2010) (**Figura 6**).

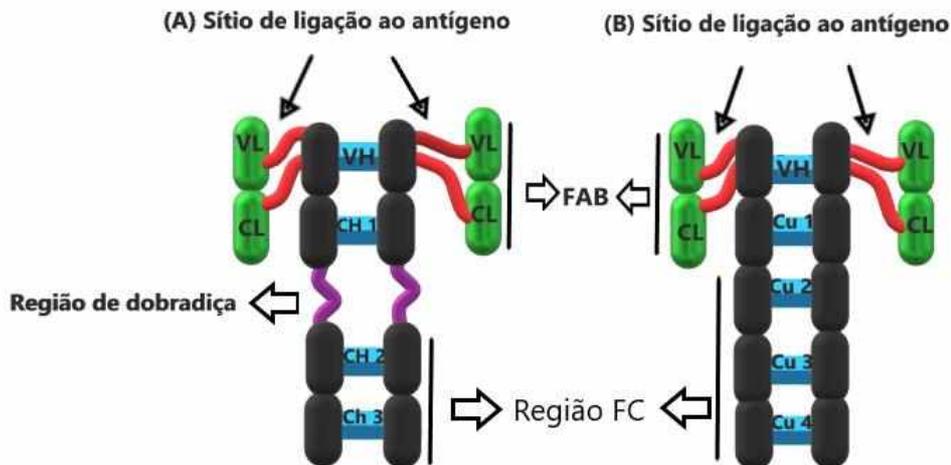


FIGURA 6: Estrutura das imunoglobulinas. A: IgG de mamífero: VH, domínio variável da cadeia pesada; VL, domínio variável da cadeia leve; CL, domínio constante da cadeia leve; CH1, CH2 e CH3, domínios constantes da cadeia pesada. B: IgY de aves: VH, domínio variável da cadeia pesada; VL, domínio variável da cadeia leve; CL, domínio constante da cadeia leve; Cu 1, Cu 2, Cu 3 e Cu 4, domínios constantes da cadeia pesada (Autoria própria).

Em relação as suas propriedades, os anticorpos IgY desempenham papéis críticos em ensaios de diagnóstico e terapia devido à sua capacidade de se ligar a alvos específicos (AMRO et al., 2018). Atualmente, a maioria das imunoglobulinas são produzidas em mamíferos, especialmente IgG em camundongos e coelhos (MICHAEL et al., 2010). Contudo, a produção de anticorpos em mamíferos pode ser desafiadora devido ao fato de que alguns antígenos provocam respostas imunes fracas ou não são imunogênicas. Além disso, a utilização de IgY em estudos científicos e ou para aplicação biotecnológica tem suas vantagens em relação a IgG principalmente relacionada ao maior rendimento. Estima-se que durante um período de 12 meses, uma galinha produz cerca de 300 ovos, e desse total de ovos é possível extrair aproximadamente 40g de IgY policlonal total das gemas. Para conseguir a mesma quantidade de IgG em coelhos, é necessário utilizar quatro animais (HATTA et al., 1993; XU et al., 2011).

Portanto, a produção de anticorpos policlonais através da imunização em galinhas torna a IgY uma excelente alternativa, para produzir os anticorpos em grande quantidade, qualidade e com baixa chance de produzir reações alérgicas, a partir de métodos simples de produção, e sem a necessidade de técnicas invasivas no animal (AMRO et al., 2018).

Levando em consideração a facilidade de produção e as propriedades químicas da IgY, um estudo demonstrou que IgY anti-PLA₂ de peçonhas de serpentes são moléculas que apresentam propriedades teranósticas (terapia e diagnóstico) (BORGES et al., 2018), principalmente, devido aos efeitos antiparasitários e seletividade específica por PLA₂. Dessa

forma, as IgY podem ser utilizadas como ferramentas na busca de possíveis alvos presentes em parasitos para desvendar o mecanismo de ação de doenças parasitárias que envolvem PLA₂ e diagnóstico (BORGES et al., 2018).

2.4 Bioeletrodo: características e aplicações

Devido as propriedades teranósticas da IgY anti-BnSP-7, a molécula pode ser utilizada com a finalidade de diagnóstico e detecção de PLA₂, com a imobilização dos anticorpos em eletrodos que geram um sensor químico capaz de detectar antígenos específicos com alta seletividade. Um bioeletrodo é definido como um dispositivo que transforma a informação química em um sinal analítico, e os biossensores podem ser definidos como dispositivos que convertem um sinal bioquímico em um sinal mensurável, constituídos de um material biológico como elemento de reconhecimento (**Figura 7**) (THEVENOT et al., 2001; GRIFFIN; STRATISCULLUM, 2009).

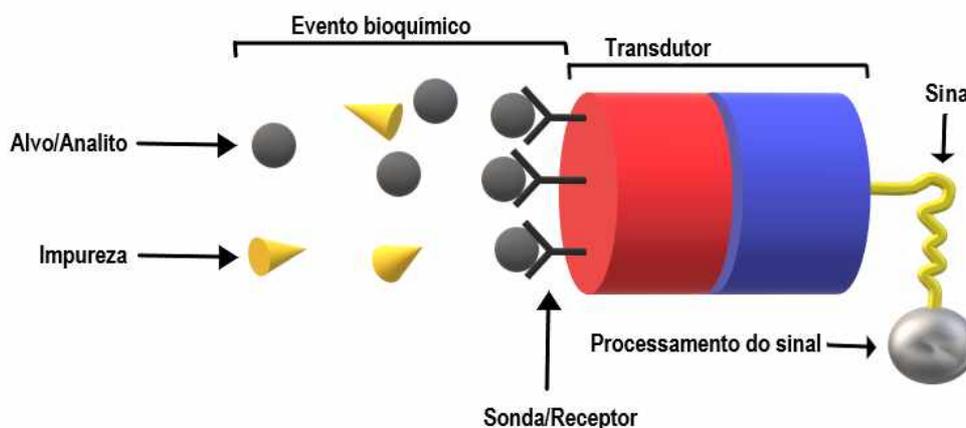


FIGURA 7: Esquema representativo de um biossensor/imunossensor (autoria própria).

Os biossensores são constituídos por três componentes principais, o elemento de reconhecimento biológico, o qual identifica o alvo, o transdutor, que converte este reconhecimento em um sinal mensurável e o sistema de processamento de sinal, que envolve a amplificação e exibição dos dados em um formato apropriado (PERUMAL; HASHIM, 2014). Os biossensores podem ser classificados de acordo com o princípio de transdução do sinal, tais como, eletroquímicos, piezoelétricos, calorimétricos e ópticos. Os biossensores eletroquímicos são baseados no consumo e/ou geração de espécies eletroativas durante uma interação química

e biológica (MEHRVAR; ABDI, 2004), nesse processo o transdutor mensura o sinal eletroquímico produzido por essa interação.

Quando o elemento de reconhecimento biológico imobilizado é um anticorpo, os biossensores são classificados como imunossensores, e eles desempenham um papel importante na melhoria da saúde pública, por proporcionar aplicações para uma detecção rápida, sensível e específica, em áreas como a química clínica, qualidade dos alimentos, monitoramento ambiental e diagnóstico (RAMÍREZ et al., 2009). Além disso, apresentam a vantagem de detecção rápida, baixo custo, em bioeletrodos a base de grafite, e de fácil manuseio, pois são portáteis e não necessitam de mão de obra especializada para operação (LEE et al., 2019; CORDEIRO et al., 2019).

Com a finalidade de funcionalizar a superfície dos eletrodos de grafite para propiciar a imobilização de anticorpos, materiais à base de grafeno e derivados, juntamente com filmes poliméricos de tiramina são nanocompósitos utilizados para modificar a superfície. O grafeno é um material que apresenta propriedades como alta resistência mecânica, leveza e alta condutividade de calor e eletricidade, e quando em uma única camada, temos o óxido de grafeno (OG), no entanto, o óxido de grafeno conduz pouca corrente elétrica devido à interrupção da nuvem π de elétrons, sendo necessário uma redução de alguns grupos funcionais em sua estrutura (Figura 8). Estes nanocompósitos são fundamentais na construção do bioeletrodo, pois elevam a área superficial do eletrodo, aumentando a sensibilidade do sistema, além de apresentarem grupos funcionais expostos que facilitam a incorporação do material biológico (FENG et al., 2014; SPATARU et al., 2009).

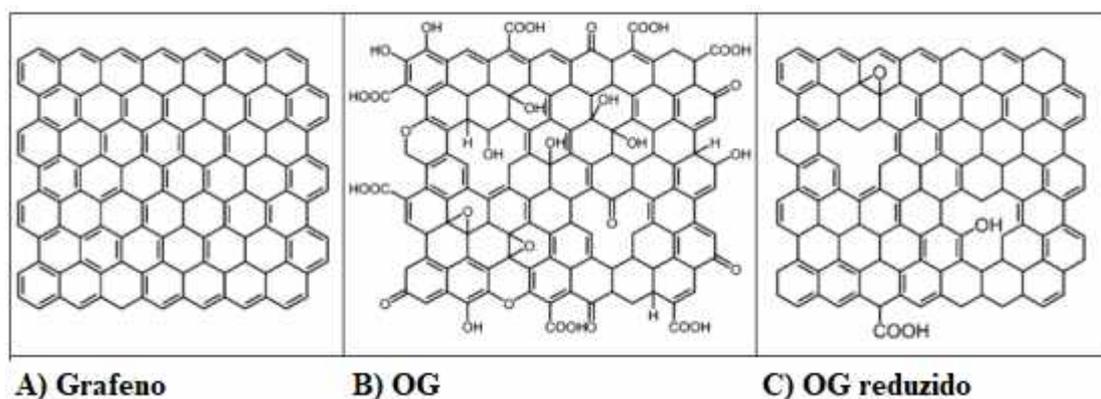


Figura 8: Diferenças entre Grafeno, OG e OG reduzido. GRIGGS; MEDINA (2016).

Deste modo, de acordo com Borges et al, 2018 a imobilização de anticorpos IgY anti-PLA₂ em sensores químicos pode trazer benefícios para o diagnóstico precoce da doença o que

traria melhores resultados para a terapêutica. A busca de novos métodos de detecção de antígenos presentes em extratos parasitários pode auxiliar na investigação de um diagnóstico precoce da doença parasitária sem causar prejuízo econômico-financeiro aos cofres públicos, uma vez que o agravamento da doença pode trazer maiores dispêndios para um tratamento mais eficaz.

3.0 OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivo construir bioeletrodos para avaliar o potencial do anticorpo policlonal IgY anti-BnSP-7 de identificar antígenos em amostras com maior índice ELISA oriundas de extratos brutos de promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis*, *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) infantum*.

3.1 Objetivos Específicos

- Preparar extrato celular bruto das linhagens de *Leishmania (L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) infantum*.
- Avaliar os níveis de índice ELISA das diferentes espécies de *Leishmania spp.*
- Construir bioeletrodos de grafite modificados com um nanocompósito e anticorpos IgY anti-BnSP-7 imobilizados para a detecção de antígenos no extrato bruto da amostra que apresentar maior índice ELISA.

4.0 MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Obtenção da toxina e anticorpo IgY anti-BnSP7

A peçonha de *B. pauloensis* utilizada para a purificação da PLA2 BnSP7 foi obtida a partir de espécimes mantidas no Centro de Extração de Toxinas Animais, Ltda. - CNPJ: 08.972.260 / 0001-30, Morungaba, SP, Brasil. Este serpentário obteve comprovação de registro no Instituto Brasileiro do Meio Ambiente (IBAMA) e uso de recursos naturais renováveis (cadastro n ° 2087163). A atividade de acesso ao Patrimônio Genético para as pesquisas com

Toxinas Animais no Laboratório de Bioquímica e Toxinas Animais (Labitox) foi cadastrada no SisGen, em atendimento ao previsto na Lei nº 13.123/2015 e seus regulamentos, com o número do cadastro: **A2C2534**.

A toxina BnSP-7 e os anticorpos policlonais IgY anti-BnSP-7 e IgY-BPS (controle negativo) produzidos pelo processo de imunização de galinha poedeiras (*Gallus gallus domesticus*, linhagem Isa Brown) foram obtidos a partir do Banco de Toxinas do Labitox do Instituto de Biotecnologia da Universidade Federal de Uberlândia.

4.2. Cultivo de parasitos

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

4.3 Extração de proteínas

A extração de proteínas foi realizada em promastigotas de *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) infantum* pelo método de criólise. Primeiramente, o meio de cultura contendo os parasitos em fase estacionária de crescimento foi submetido à centrifugação de 2000 rpm por 7 min. Os pellets de parasitas foram lavados em solução salina tamponada com fosfato (PBS, pH 7,2) duas vezes e ressuspensos em 1 mL de inibidor de protease (Complete Ultra Tablets, Roche) diluído em PBS. A criólise foi realizada com seis ciclos de congelamento (nitrogênio líquido) e descongelamento (banho maria a 37°C), realizados para obtenção do extrato bruto. Posteriormente, alíquotas foram removidas do extrato bruto e submetidas a duas velocidades de centrifugação, sendo que a 4000 x g foi denominada velocidade normal (N), e a 10000 x g velocidade diferenciada (D), ambas por 10min em uma centrífuga refrigerada (4°C). O pellet foi descartado e coletado o sobrenadante (extrato solúvel) e congelado a -20°C.

4.4 Dosagem de proteínas

A determinação da concentração de proteínas foi realizada conforme o método descrito por Bradford (1976), com modificações. 150µL do reagente de Bradford (100 mg de Comassie Blue G, 50 mL de etanol 95%, 100 mL de ácido fosfórico 85% e água deionizada suficiente para completar 1L de solução) foram adicionados às amostras contendo 1µL de extrato de *Leishmania* spp., PLA2 BnSP7, anticorpos (IgY-anti BnSP-7, IgY-PBS) e 49µL de água Milli Q, após 10 min as amostras foram lidas numa densidade óptica de 595 nm. A curva padrão de soroalbumina bovina (2mg/mL) foi construída para análise de regressão linear dos dados. Desse modo, a concentração das proteínas (µg/µL) foi determinada a partir de cálculos de regressão linear baseados nos valores obtidos na curva padrão.

4.5 Determinação do maior Índice ELISA nos extratos de *Leishmania* spp.

O teste ELISA foi realizado para avaliar dentre os extratos de *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) infantum* qual possui o maior Índice ELISA, e a partir disso selecionar qual extrato será utilizado na construção do bioeletrodo. O teste foi realizado em microplacas de 96 poços de poliestireno de baixa afinidade (Greiner Bio-One, Kremsmünster, Áustria) recobertas com 10 µg / mL dos diferentes extratos proteicos dos parasitas correspondentes e incubadas durante a noite a 4°C. Após lavar os poços cinco vezes com PBS contendo Tween 20 a 0,05% (v/v) (PBST), foi adicionado leite em pó sem gordura (50 µL / poço) em PBS-T (1% PBS-T-M) como solução de bloqueio. A seguir, as placas foram incubadas por 1 h a 37°C e lavadas cinco vezes com PBS-T. Amostras contendo IgY anti-BnSP-7 (30 µg / mL), IgY anti-*Leishmania* (1: 100) (controle positivo) e anticorpos IgY PBS (30 µg / mL) controle negativo foram diluídas em PBS-T-M a 1% TM, adicionadas e incubadas durante 1h a 37°C. Após 5 lavagens com PBS-T, o anticorpo secundário *anti-chicken* IgY, produzido em coelho e conjugado com peroxidase (Sigma-Aldrich Co., EUA), foi diluído 1: 15.000 em 1% PBS-TM, adicionado e incubado por 1 h em 37°C. Após 5 lavagens, a reação foi desenvolvida pela adição de O-fenilenodiamina (Sigma-Aldrich Co., EUA) com peróxido de hidrogênio 0,03% (v/v) (Merck, Brasil) diluído em 0,1 M de tampão fosfato de citrato (pH 5,5), por 15 min. A reação foi interrompida pela adição de 25 µL de H₂SO₂ 1M (Vetec, Brasil). A densidade óptica (DO) foi determinada a 492 nm numa leitora de placa (Multiskan GO, Thermo Scientific).

Os dados foram expressos como Índice ELISA/ELISA Index (EI): $EI = DO / \text{cutoff}$ dos controles negativos mais três desvios padrão. Para estabelecer os valores de corte, foi utilizado a DO do anticorpo IgY obtido de aves imunizadas com PBS (grupo controle negativo) cedido pelo Laboratório de Bioquímica e Toxinas Animais da Universidade Federal de Uberlândia. Valores de $IE > 1,2$ foram considerados positivos.

4.6 Construção do bioeletrodo e medidas eletroquímicas

4.6.1 Construção do eletrodo de grafite utilizando célula eletroquímica de 3 compartimentos

A construção do eletrodo de trabalho de grafite (**Figura 9**) foi realizada com a junção de um suporte de teflon (**Figura 9-A**) que se encaixa a um suporte de latão (**Figura 9-B**), no qual é colado um disco de grafite de 6 mm com cola de prata (**Figura 9C**), resultando no eletrodo (**Figura 9-F**) que é encaixado em uma base com haste de latão (**Figuras 9-D e 9-E**).



FIGURA 9: Representação da construção do eletrodo de trabalho. (A) base de Teflon®, (B) encaixe de Latão, (C) disco de grafite (99,9995% de pureza, Alfa Aesar), (D) base com haste de latão, (E) haste encaixada ao eletrodo, (F) eletrodo (autoria própria).

Os discos de grafite de 6 mm utilizados para construir os eletrodos de trabalho possuem 99,9995% de pureza. Foi utilizado cola epóxi para preencher os espaços entre o sistema latão/grafite e a base. A seguir foi feito um polimento manual do eletrodo em lixas com granulação de 400 cm^2 e 1500 cm^2 , com a finalidade de nivelar a superfície do grafite. Em sequência, foi realizado um polimento mais fino utilizando uma solução de alumina 0,3 μm sobre feltro. Após a etapa de polimento manual, o eletrodo de trabalho foi submetido a uma voltametria cíclica com potencial elétrico entre 0 a 1,2 V (vs. Ag/AgCl) e $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$ em

solução de ácido sulfúrico $0,5 \text{ mol L}^{-1}$, para uma melhor padronização uniforme da qualidade dos eletrodos.

Os testes eletroquímicos foram executados em uma célula eletroquímica com três compartimentos (**Figura 10**), e capacidade para 25 mL de solução, em um potenciostato da marca *CH Instruments, modelo 760C*. Os seguintes eletrodos foram utilizados: eletrodo de trabalho de grafite, eletrodo de referência de Ag/AgCl e KCl (3 mol L^{-1}) e eletrodo auxiliar de platina.

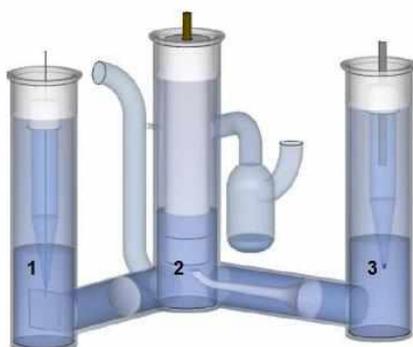


FIGURA 10: Esquema da célula eletroquímica de 3 compartimentos utilizada neste estudo. (1) eletrodo auxiliar, (2) eletrodo de trabalho (conectado na base de latão e envolto em teflon) e (3) eletrodo de referência: adaptado de RODOVALHO, 2014.

4.6.2 Incorporação do óxido de grafeno reduzido eletroquimicamente

Na etapa seguinte, óxido de grafite (OGra) foi disperso em água deionizada em uma razão de 1:1 (mg:mL), e submetido a sonicação por 2 horas, para obter o óxido de grafeno (OG). A dispersão foi centrifugada durante 10 min a 3.500 rpm. A seguir foi coletado do sobrenadante $30 \mu\text{L}$ da dispersão, que foi gotejada na superfície do eletrodo de grafite, que mantido a $50 \text{ }^\circ\text{C}$ até a solução se secar. Depois de seco, o eletrodo de grafite foi conectado à célula de três compartimentos contendo PBS ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,0). A redução eletroquímica foi realizada por voltametria cíclica numa faixa de potencial de 0 a $-1,5 \text{ V}$ (vs. Ag/AgCl) e $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$, mediante 10 ciclos de potencial, obtendo o óxido de grafeno reduzido eletroquimicamente adsorvido no eletrodo de grafite. Em sequência, o eletrodo de trabalho foi mergulhado em água deionizada e secado com gás nitrogênio ultrapuro conforme a figura 11.

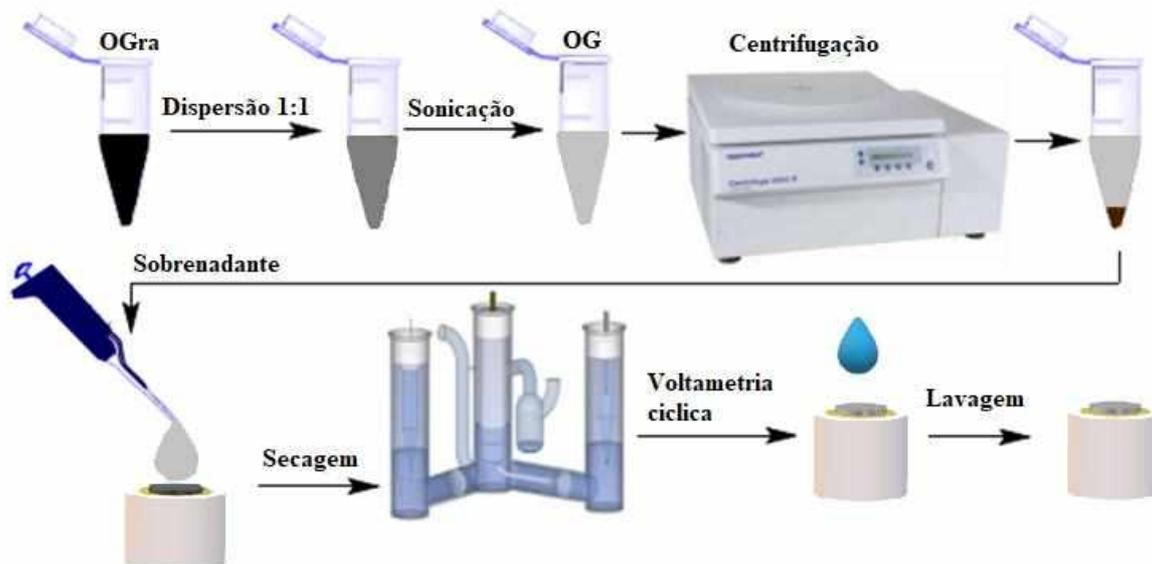


FIGURA 11: Esquema da incorporação de OG eletroquimicamente reduzido (autoria própria).

4.6.3 Polimerização de tiramina na superfície do eletrodo

Para funcionalizar a superfície do eletrodo de grafite com politiramina (polímero de tiramina), 0,0442 g de tiramina foi diluída em ácido sulfúrico 0,5 mol L⁻¹, a solução de ácido sulfúrico contendo tiramina 2,5 mmol L⁻¹ foi utilizada para eletropolimerizar a superfície modificada com oxido de grafeno reduzido eletroquimicamente adsorvido no eletrodo de grafite, na janela de potencial de 0,00 a +1,10 V, numa velocidade de varredura de 50 mVs⁻¹ por meio de voltametria cíclica fixando-se 60 ciclos de potencial (**Figura 12**).

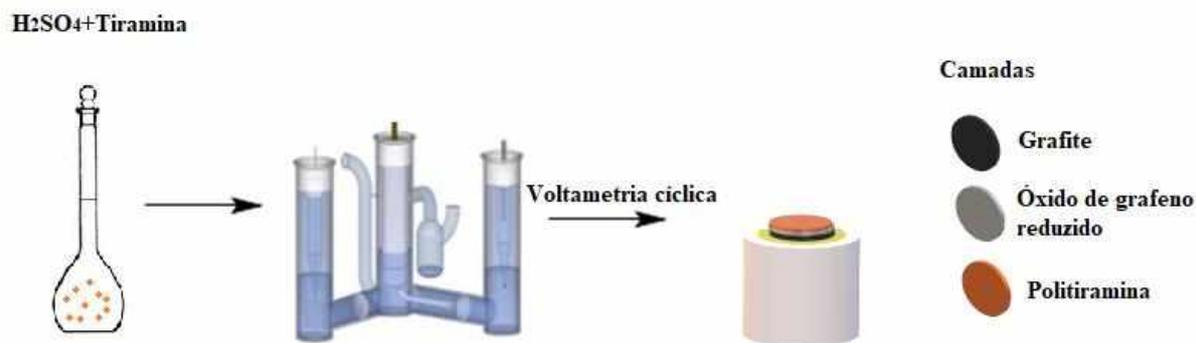


FIGURA 12: Esquema da polimerização de tiramina (autoria própria).

Visando avaliar a área da superfície modificada com oxido de grafeno reduzido eletroquimicamente adsorvido no eletrodo de grafite e politiramina, os eletrodos foram

avaliados por voltametria cíclica, utilizando-se ácido sulfúrico 0,5 mol L⁻¹ em ausência de monômero, numa velocidade de varredura de 50 mVs⁻¹, sendo duas varreduras na faixa de potencial de 0,00 V a +1,10 V e 3 varreduras de 0,00 a +0,85 V, utilizando-se o último ciclo como parâmetro para análise. Após a obtenção das curvas foi calculado a área sob a curva utilizando o *software Origin*® 8, neste estudo somente eletrodos com medidas de áreas próximas (0,5 unidades a mais ou a menos de diferença) foram utilizados, para garantir uma distribuição uniforme de anticorpos a serem imobilizados.

4.6.3 Imobilização dos anticorpos

Foram gotejados 20 µL de solução dos anticorpos IgY anti-BnSP-7 (diluídos a uma concentração de 20 µg/mL em solução tampão fosfato salino, pH = 7.4) em 10 eletrodos, e 20 µL de solução dos anticorpos PBS (grupo controle) (diluídos a uma concentração de 20 µg/mL em solução tampão fosfato salino, pH = 7.4) em outros 10 eletrodos. Os eletrodos foram incubados durante 1 hora a 37°C, em recipiente vedado e com umidade controlada, para impedir a evaporação da solução. Após a incubação, os eletrodos foram imergidos em PBS durante 10 segundos e secos em estufa a 37°C. Com o objetivo de evitar interações inespecíficas do alvo com a superfície não modificada do eletrodo, após a imobilização do IgY anti-BnSP-7, a superfície dos mesmos foi bloqueada com albumina de soro bovino (BSA). A seguir, foi coletado 30 µL de solução de BSA (0.5% m/v em solução tampão fosfato, pH = 7.4) para ser gotejado sobre o eletrodo. A seguir mesmos foram incubados por 1 hora a 37°C, em recipiente vedado e com umidade controlada, e imergidos em PBS, pH 7.4 durante 10 segundos e secos em estufa a 37°C (**Figura 13**).

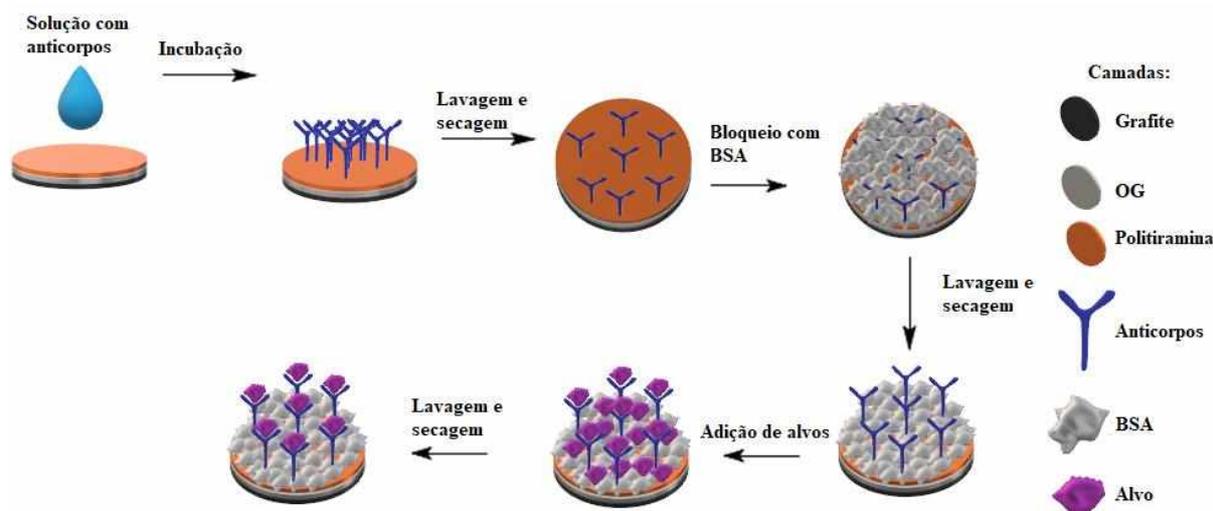


FIGURA 13: Esquema da imobilização dos anticorpos (autoria própria).

Para verificar a imobilização das biomoléculas, foi realizada uma voltametria de onda quadrada em 5 eletrodos sem e outros 5 com biomoléculas. Para isso, os eletrodos foram conectados numa célula eletroquímica de três compartimentos, contendo uma solução de ferro/ferricianeto de potássio ($K_4[Fe(CN)_6]/K_3[Fe(CN)_6] \cdot 3H_2O$, 5 mmol/L, contendo 0.1 mol/L de KCl). A voltametria de onda quadrada foi realizada numa janela de potencial de -0.1 V a +0.6 V vs. Ag/AgCl, frequência de 15 Hz e amplitude de 25 mV.

4.7 Detecção de BnSP-7 e extrato de *L. (L.) infantum* pelo bioeletrodo

Dos 10 bioeletrodos imobilizados com anticorpos IgY anti-BnSP-7, 5 foram incubados com 20 μ L de BnSP-7 (10 μ g/mL em PBS, pH 7.4), e outros 5 com 20 μ L de extrato bruto de *L. (L.) infantum* (10 μ g/mL em PBS, pH 7.4) por 30 minutos a 37°C, em recipiente vedado e com umidade controlada. De forma similar, dos 10 bioeletrodos do grupo controle, IgY PBS, 5 foram incubados com 20 μ L de BnSP-7 (10 μ g/mL em PBS, pH 7.4), e outros 5 ou 20 μ L de extrato bruto de *L. (L.) infantum* (10 μ g/mL em PBS, pH 7.4) por 30 minutos a 37°C, em recipiente vedado e com umidade controlada. Após a incubação, os eletrodos foram imersos em PBS, pH 7.4 durante 10 segundos e secos em estufa a 37°C. A detecção do alvo foi feita por voltametria de onda quadrada em solução de par redox. Para isso os eletrodos foram conectados a célula eletroquímica de três compartimentos, contendo uma solução de ferro/ferricianeto de potássio ($K_4[Fe(CN)_6]/K_3[Fe(CN)_6] \cdot 3H_2O$, 5 mmol/L, contendo 0.1 mol/L de KCl). A voltametria de onda quadrada foi realizada numa janela de potencial de -0.1 V a +0.6 V vs. Ag/AgCl, frequência de 15 Hz e amplitude de 25 mV.

4.8 Análises estatísticas

Todos os experimentos eletroquímicos foram conduzidos em duplicata para cada amostra e os resultados numéricos foram apresentados no formato de média aritmética \pm desvio-padrão. Apenas desvios-padrão inferiores a 10% da média foram considerados aceitáveis. Os picos foram corrigidos pela ferramenta Peak Analyzer, incluída no software Origin® 8. Os voltamogramas e histogramas foram construídos por meio do software Origin® 8.

5.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ELISA demonstrou maior IE para o extrato bruto de *L. (L.) infantum*

A literatura relata a importância de fosfolipases para o metabolismo de patógenos (OPPERDOES; ROY, 1982; WAINSZELBAUM et al., 2001; APARICIO et al., 2004; GRUPPI et al., 1997; VILLALTA et al., 1998; FLIEGER et al., 2001; POLLOK et al., 2003; BHANOT et al., 2005; ISTIVAN e COLOE, 2006; BURDA et al., 2015). Muitos desses patógenos procarióticos e eucarióticos são capazes de produzir e secretar PLA2 para o meio extracelular, e estas enzimas podem participar do processo de remodelamento da membrana plasmática que pode facilitar a invasão nas células hospedeiras modulando diferentes mecanismos intracelulares. Estes estudos indicam que mudanças significativas na arquitetura molecular da membrana da célula hospedeira induzidas por PLA2s são resultado da ação parasitária. Dessa forma essas enzimas têm sido associadas com o potencial de virulência de muitos patógenos. Dada a importância do mecanismo de ação de PLA2s no processo de invasão de parasitos em células hospedeiras e ao seu potencial de virulência, a detecção dessas proteínas em patógenos por imunodeteção pode gerar uma estratégia molecular importante tanto para o diagnóstico e/ou tratamento de doenças parasitárias. Assim, o presente trabalho utilizou o teste de ELISA para avaliar qual dos extratos proteicos de *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) infantum* apresentaria o maior Índice ELISA para utilizá-lo no ensaio de bioeletrodo.

Neste estudo, extratos proteicos de *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) infantum* foram obtidos por criólise utilizando duas velocidades distintas de centrifugação. Esta metodologia foi utilizada com o intuito de obter duas frações proteicas diferentes fundamentando-se na hipótese de que, na velocidade de rotação de 4000 x g o sobrenadante teria uma maior concentração de proteínas de membrana, pois com a lise da membrana e uma

baixa velocidade de centrifugação as proteínas agregadas à membrana permaneceriam no sobrenadante com maior facilidade. Já na velocidade de rotação de 10000 x g, além das proteínas de membrana, o extrato proteico solúvel também teria proteínas citoplasmáticas devido a maior velocidade de rotação, que pode favorecer o deslocamento dessas proteínas para o sobrenadante (MORAES et al., 2013).

A avaliação dos Índices ELISA do anticorpo IgY anti-BnSP-7 sobre extratos proteicos de *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) infantum* é apresentado na **Figura 14**. Como pode ser observado, o extrato proteico obtido por criólise e por centrifugação a 4000 x g foi reconhecido pelo anticorpo IgY anti-BnSP-7 nas três espécies de *Leishmania* (**Figura 14 A, B e C**) com IE maior que 1,2. Além disso, o anticorpo IgY controle negativo não foi capaz de reconhecer nenhum dos extratos proteicos advindos das três espécies de *Leishmania*, sugerindo uma imunoespecificidade do anticorpo IgY anti-BnSP-7 sobre proteínas do parasita.

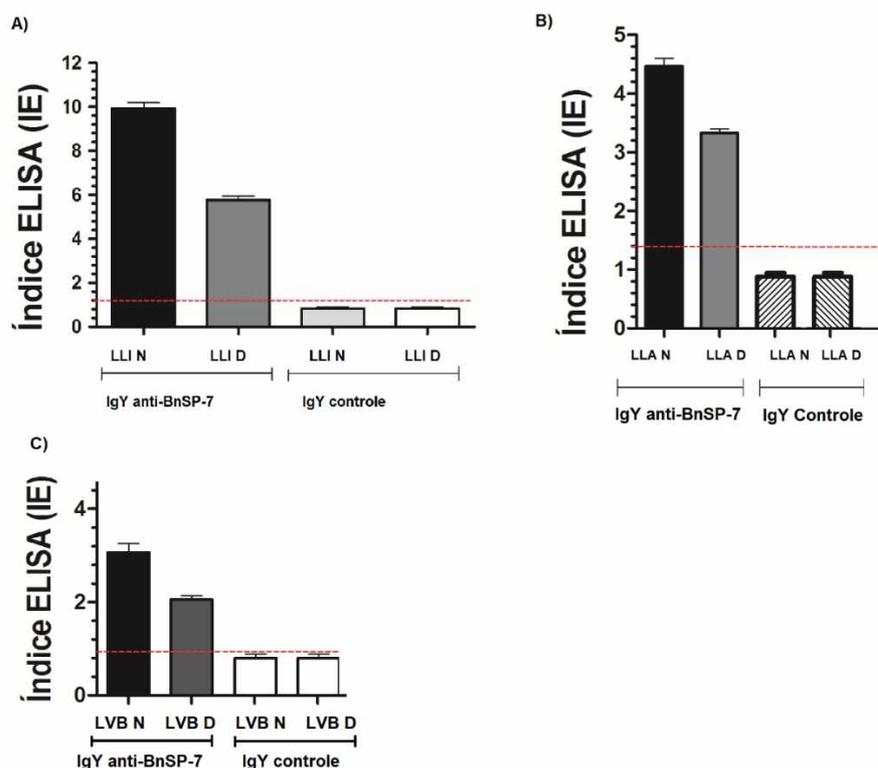


FIGURA 14: Índice ELISA das amostras de extrato celular bruto das diferentes linhagens de *Leishmania* nas velocidades de centrifugação normal (N) (4000 g) e diferenciada (D) (10000 g). A) ELISA em *L. (L.) infantum*, na velocidade de centrifugação normal (LLI N) e diferenciada (LLI D). B) ELISA em *L. (L.) amazonenses*, na velocidade de centrifugação normal (LLA N) e diferenciada (LLA D). C) ELISA em *L. (V.) braziliensis*, na velocidade de centrifugação normal (LVB N) e diferenciada (LVB D). Os resultados são apresentados em IE com média e desvio padrão. A linha tracejada representa o limite de detecção de IE = 1,2.

O anticorpo IgY anti-BnSP-7 também foi mais eficaz em reconhecer proteínas dos extratos proteicos de *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) infantum* obtidos por centrifugação normal (4000 x g), provavelmente por esses extratos possuírem um conteúdo maior de antígenos alvo presentes em fragmentos de membrana plasmática, sendo que o extrato de *L. (L.) infantum* foi aquele que apresentou o maior Índice ELISA (IE=10), em relação a *L. (L.) amazonensis* (IE= 4,4) e *L. (V.) braziliensis* (IE= 2,8), e dessa forma portanto, o extrato proteico de *L. (L.) infantum* foi selecionado para avançar nos testes eletroquímicos, visando a construção de um bioeletrodo. Estudos demonstraram que PLA₂ podem estar envolvidas com a virulência de *L. (L.) amazonensis* e que o anticorpo IgY anti BnSP-7 é capaz de reduzir a capacidade que o parasito possui de infectar células, além de demonstrar uma grande capacidade de opsonizar a membrana do parasito com ensaios de imunofluorescência (Borges et al., 2018).

O uso de testes ELISA iniciou-se na década de 70, e nos dias de hoje é amplamente empregado para o diagnóstico da leishmaniose, pois tem a capacidade de analisar um grande número de amostras ao mesmo tempo com elevada sensibilidade, entretanto, sua especificidade é influenciada pelo tipo de antígeno utilizado no teste (ALVES; BEVILACQUA, 2004; MAIA; CAMPINO, 2008). Diversos antígenos vêm sendo testados com o ELISA, sendo que os antígenos solúveis de extrato celular brutos derivados do lisado de promastigotas de *Leishmania* spp. são os mais utilizados (SINGH; SIVAKUMAR, 2003; RYAN et al., 2002; SINGH, 2006). A proteína K39 que pertence à superfamília das cinesinas, proteínas motoras de *Leishmania* spp. tem sua forma recombinante, rK39, amplamente utilizada como antígeno para a realização de diagnóstico por ELISA, pois a literatura científica considera este antígeno como o mais efetivo para o diagnóstico sorológico de leishmaniose (BURNS et al., 1993). Entretanto, devido à alta variabilidade genética na população mundial, o antígeno rK39 se mostrou pouco eficiente em algumas regiões da África, pois os infectados de áreas endêmicas do Sudão apresentam baixos títulos de anticorpos contra a K39 (RITMEIJER, et al., 2006). Essas informações apontam que novos antígenos precisam ser estudados para executar diagnósticos precisos em regiões onde antígenos já utilizados com o rK39 não são efetivos. Dessa forma, novos estudos dos alvos do anticorpo IgY anti-BnSP-7 são necessários, pois esses alvos podem ser antígenos promissores para futuros diagnósticos por ELISA e biossensores.

5.2 O bioeletrodo foi efetivo em detectar alvos em extrato bruto de *L. (L.) infantum*

Após avaliar o maior IE do anticorpo IgY anti-BnSP7 no extrato celular bruto de *L. (L.) infantum* em relação aos extratos proteicos obtidos das demais espécies de *Leishmania spp.*, a capacidade de detecção de alvos presentes no extrato parasitário de *L. (L.) infantum* foi avaliada por meio de técnicas eletroquímicas, através da construção de um bioeletrodo. Assim, bioeletrodos de grafites modificados com OG reduzido e politiramina foram imobilizados com os anticorpos IgY anti-BnSP-7 obtidos tanto pela imunização com a proteína alvo BnSP-7 como por imunização apenas com PBS (IgY PBS). Apesar de ter sido utilizado um n amostral de 5 eletrodos por experimento, alguns sofreram lixiviação da superfície durante as etapas de montagem manual e foram descartados. Assim, a **Figura 15** apresenta os voltamogramas de onda quadrada que representam a média e desvio padrão dos dados de corrente obtidos de duplicatas de cada análise e a **figura 16** os mesmos dados na forma de histograma.

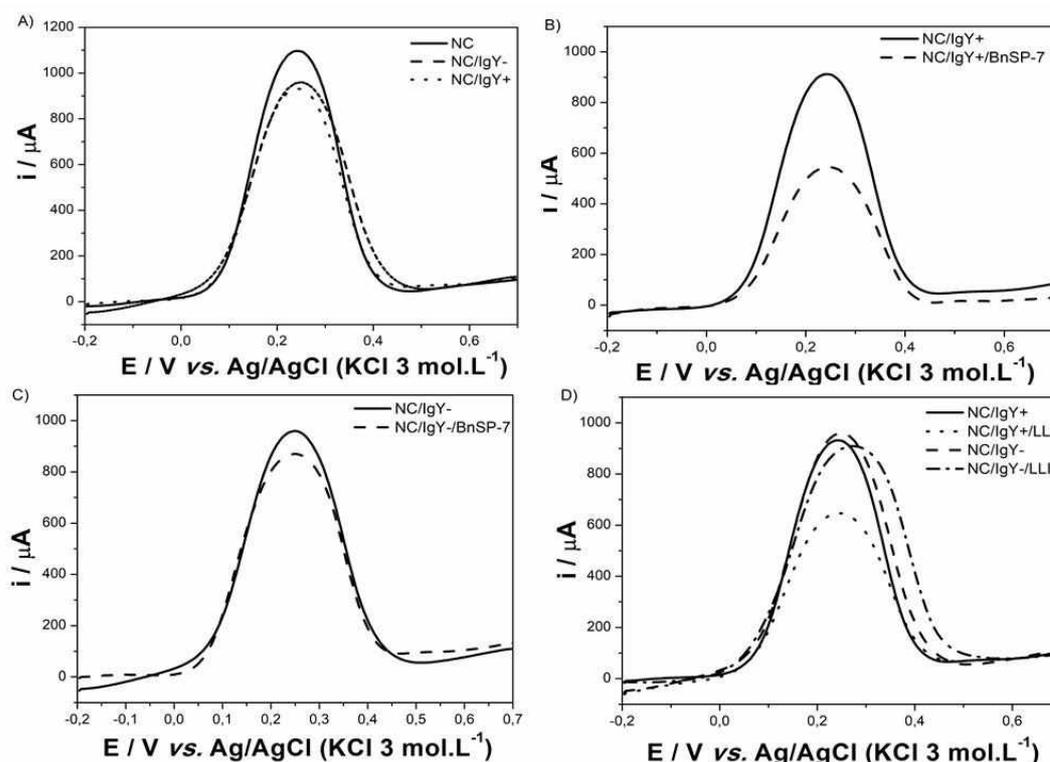


FIGURA 15: Voltamogramas da superfície do eletrodo modificado na presença e na ausência das biomoléculas sondas (anticorpos) com e sem alvo, na presença da sonda redox ferro/ferricianeto de potássio ($K_4[Fe(CN)_6]/K_3[Fe(CN)_6].3H_2O$). (A) NC representa o bioeletrodo com o nanocompósito, NC/IgY- representa o bioeletrodos com nanocompósito imobilizado com sondas negativas (IgY anti-PBS), NC/IgY+ representa o bioeletrodo com nanocompósito imobilizado com sondas positivas (IgY anti-BnSP-7). (B) NC/IgY+/BnSP-7 representa o bioeletrodo com nanocompósito imobilizado com a sonda positiva e o alvo (BnSP-7). (C) NC/IgY-

/BnSP-7 representa o bioeletrodo com nanocompósito imobilizado com a sonda negativa e o alvo (BnSP-7). (D) NC/IgY+/LLI representa o bioeletrodo com nanocompósito imobilizado com a sonda positiva e extrato bruto de *L. (L.) infantum* (LLI), NC/IgY-/LLI representa o bioeletrodo com nanocompósito imobilizado com a sonda negativa e extrato bruto de *L. (L.) infantum* (LLI). Os resultados são apresentados com média e desvio padrão.

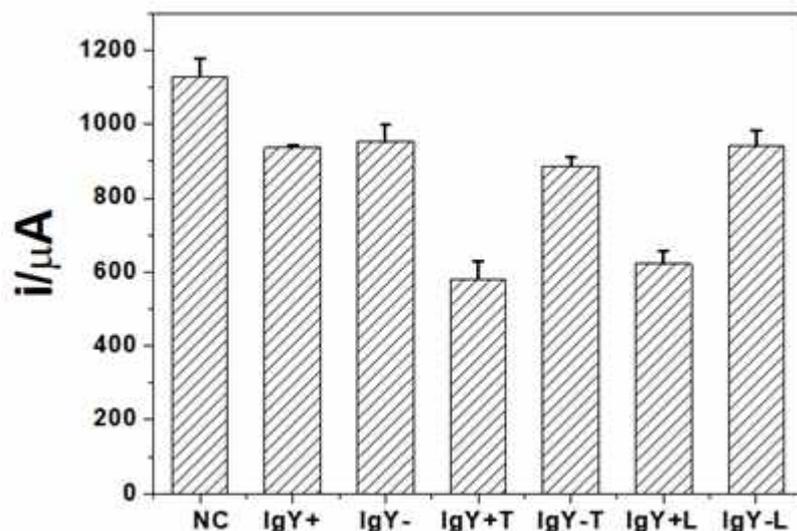


FIGURA 16: Histograma dos dados de pico de corrente. NC representa o bioeletrodo de grafite com o nanocompósito, IgY+ representa o bioeletrodo imobilizado com os anticorpos anti-BnSP-7, IgY- representa o bioeletrodo imobilizado com anticorpos IgY imunizados com PBS. IgY+T representa o bioeletrodo de sonda positiva com BnSP-7, IgY-T representa o bioeletrodo com a sonda negativa e BnSP-7. IgY+L representa o bioeletrodo com a sonda positiva e extrato bruto de *L. (L.) infantum*; IgY-L representa o bioeletrodo com a sonda negativa e extrato bruto de *L. (L.) infantum*. Os resultados são apresentados com média e desvio padrão

Observa-se que na ausência de biomoléculas, ou seja, apenas no eletrodo de grafite com o nanocompósito (NC) (**Figura 15 A**), a corrente do pico de oxidação resultante é maior (1129,4 μA), sendo que ao imobilizar os anticorpos a corrente reduz aproximadamente 176 μA para sonda negativa (NC/IgY-) (**Figura 15 A**) e 193,3 μA para a sonda positiva (NC/IgY+) (**Figura 15 A**). No entanto, quando a sonda positiva se liga ao alvo (NC/IgY+/BnSP-7) a corrente decresce para aproximadamente 550 μA (**Figura 15 B**). Por outro lado, não é observado grande diferença nos valores da corrente elétrica quando o bioeletrodo contendo o anticorpo IgY-PBS, sonda negativa, é testado com a PLA2 BnSP-7 (**Figura 15 C**). A redução da corrente elétrica é devido a presença da camada proteica de anticorpos, que atua como um bloqueio físico aos íons da solução, impedindo que cheguem à superfície do eletrodo e sofram oxidação, dessa forma há um decaimento de corrente com a imobilização da sonda. O bloqueio é ainda maior após a interação entre a sonda positiva com seu alvo complementar. Esses dados

indicam que a imobilização por adsorção física, mantida por forças de Van der Waals e ligações covalentes com a politiramina, foi efetiva e que o bioeletrodo consegue diferenciar quando a sonda reconhece o alvo. Em adição, o bioeletrodo contendo o anticorpo IgY anti-BnSP7 foi eficaz em reconhecer o extrato proteico obtido de *Leishmania infantum*, diminuindo a corrente elétrica para aproximadamente 623 μ A (**Figura 15 D**), ao contrário dos anticorpos IgY-PBS (**Figura 15 D**) que não diminuíram a corrente elétrica assim como os bioeletrodos que contém apenas sonda.

Estes resultados sugerem a eficiência dos anticorpos IgY anti-BnSP7 em reconhecer epítomos de proteínas de *L. (L) infantum* semelhantes aqueles presentes na PLA2 BnSP7. No entanto, novos estudos visando a purificação e identificação de proteínas alvo do anticorpo anti BnSP7 em *L. (L) infantum* devem ser realizados para se buscar quais domínios estruturais nestas proteínas dividem similaridade estrutural.

Os resultados obtidos neste estudo corroboram com estudos prévios que demonstraram a capacidade do bioeletrodo de grafite modificado com IgY anti-BnSP-7, de identificar a presença de antígenos em *L. (L) amazonenses* (Borges et al., 2018). Os mesmos autores também demonstraram que bioeletrodos contendo IgY anti-BnSP-7 não foram capazes de detectar proteínas oriundas de extratos proteicos de células do sangue periférico humano, sugerindo uma maior especificidade do bioeletrodo para proteínas parasitárias em relação as proteínas de células do hospedeiro. Os resultados prévios descritos por Borges et al. 2018, bem como os demonstrados no presente estudo sugerem que tais proteínas possam ser PLA2s presentes nas células parasitárias. No entanto, novos estudos de isolamento de proteínas e de sequenciamento proteico devem ser realizados a fim de identificar tais proteínas alvo e corroborar suas atividades com a virulência desses parasitos.

6.0 Conclusão

Neste estudo, demonstramos que anticorpos policlonais (IgY) produzidos em galinha contra uma proteína oriunda de peçonha ofídica (PLA2 BnSP7) foram capazes de reconhecer extratos proteicos de linhagens de *Leishmania* spp por ELISA, apresentando IE maior para o extrato proteico de *L. (L) infantum*. O anticorpo IgY anti-BnSP-7 também foi eficiente para a construção de um bioeletrodo capaz de reconhecer proteínas presentes no extrato proteico de *L. (L) infantum*. Os resultados oriundos deste estudo demonstram o potencial dos anticorpos IgY anti-BnSP-7 como uma ferramenta promissora para novos estudos que visam a criação de alternativas para o diagnóstico ou tratamento de Leishmaniose.

8.0 REFERÊNCIAS

- ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; PILLAI, S. **Cellular and Molecular Immunology**. 6th Edition. Saunders Elsevier Philadelphia, 566p.
- ALEXANDER J, SATOSKAR AR, RUSSELL DG. Leishmania species: models of intracellular parasitism. **J Cell Sci**. 1999;112(Pt 18):2993-3002.
- ALVAR, J., VeELEZ, I.D., BERN, C. et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **PLOS ONE**. v.7, e3567, 2012.
- ALVES WA, BEVILACQUA PD. (2004). Quality of diagnosis of canine visceral leishmaniasis in epidemiological surveys: an epidemic in Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, 1993-1997.
- AMRO, W.A.; AL-QAISI, W.; AL-RAZEM, F. Production and purification of IgY antibodies from chicken egg yolk. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**. v.16, p.99–103, 2018
- APARICIO, I. M.; SCHARFSTEIN, J.; LIMA, A. P. C. A.; “A new cruzipain-mediated pathway of human cell invasion by *Trypanosoma cruzi* requires trypomastigote membranes,” **Infection and Immunity**, v. 72, n. 10, p. 5892–5902, 2004.
- ARNI, R.K.; WARD, R.J. Phospholipase A₂—a structural review. **Toxicon**, v. 34, p. 827–841, 1996.
- BATES P.A., ROGERS M.E. New insights into the developmental biology and transmission mechanisms of *Leishmania*. **Curr. Mol. Med**. 2004.
- BELAUNZARÁN, M. L.; LAMMEL, E. M.; E.L.D. de Isola, Phospholipases A in trypanosomatids, **J. Enzym. Res**. p. 1–10, 2011.
- BELAUNZARÁN, M. L.; VELANDIA, A.; LAMMEL, E. M.; “Identification, cloning and expression of a novel Phospholipase A from *Leishmania braziliensis*,” **Biocell**. 34 p. 91, 2010.
- BELAUNZARÁN, M.L.; WAINZELBAUM, M. J.; LAMMEL, E. M. “Phospholipase A from *Trypanosoma cruzi* infective stages generates lipid messengers that activate host cell protein kinase c,” **Parasitology**, v. 134, p. 491–502, 2007.
- BHANOT, P.; SCHAUER, K.; COPPENS, I.; NUSSENZWEIG, V. A surface phospholipase is involved in the migration of *Plasmodium* sporozoites through cells, **J. Biol Chem**. v.28, p. 6752–6760, 2005.
- BORGES I.P.; SILVA M.F.; SANTIAGO F.M.; FARIA L.S.; JÚNIOR Á.F.; SILVA R.J.; COSTA M.S.; FREITAS V.; YONEYAMA K.A.G.; FERRO E.A.V.; LOPES D.S.; RODRIGUES R.S.; RODRIGUES V.M. Antiparasitic effects induced by polyclonal IgY antibodies anti-phospholipase A2 from *Bothrops pauloensis* venom. **International Journal of Biological Macromolecules**. v. 112, p 333-342, 2018.

BRADFORD, M. M. Rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, n. 72, p. 248-254, 1976.

BUCZYNSKI, M.; DUMLAO, D.; DENNIS, E.; Thematic review series: proteomics. An integrated omics analysis of eicosanoid biology, **J. Lipid Res.** v. 50 1015–1038, 2009.

BURDA, P.C. A Plasmodium phospholipase is involved in disruption of the liver stage parasitophorous vacuole membrane. **PLoS Pathogens.** v.11, p.e1004760, 2015.

BURNS JM Jr, SHREFFLER WG, BENSON DR, GHALIB HW, BADARO R, REED SG 1993. 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.** 90(2):775-9.

CASSAING, S., FAUVEL, J., BESSIÈRES, M.-H., GUY, S., SÉGUÉLA, J.-P., CHAP, H., 2000. *Toxoplasma gondii* secretes a calcium-independent phospholipase A2. **Int. J. Parasitol.** 30, 1137-1142. doi:10.1016/S0020-7519(00)00101-6

CHALGHOUMI, R.; BECKERS, Y.; PORTETELLE, D.; THÉWIS, A. Hen egg yolk antibodies (IgY), production and use for passive immunization against bacterial enteric infections in chicken: a review. **Biotechnology, Agronomy, Society and Environment.** v.13, p.295–308, 2009.

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

CORRÊA, L. C. Estudos estruturais com a BthTX-II, uma Asp49-Fosfolipase A2 miotóxica e com baixa atividade catalítica do veneno de *Bothrops jararacussu*. Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Mestre no Programa de PG em Biologia Geral e Aplicada. 2007.

COSTA, J. M. L.; Modalidades Clínicas da Leishmaniose Tegumentar. In Barral A, Costa JML, editores. *Leishmanias e Leishmania Tegumentar nas Américas.* **Gráfica Contexto,** Salvador p.138-145, 2011.

DANTAS-TORRES, F.; Leishmune® vaccine: The newest tool for prevention and control of canine visceral leishmaniasis and its potential as a transmission-blocking vaccine. **Vet Parasitol.** v. 141 p. 1-8, 2006.

DA SILVA GIOTTO, M.T.; GARRAT, R.C.; OLIVA, G.; MASCARENHAS, Y.P.; GIGLIO, J.R.; CINTRA, A.C.O.; DE AZEVEDO JR.; W.F.; ARNI, R.K.; WARD, R.J. Crystallographic and spectroscopic characterization of a molecular hinge: conformational changes in bothropstoxin I, a dimeric Lys49 phospholipase A2 homologue. **Prot. Struct. Funct. Genet.** v. 30, p. 442–454, 1998.

DE LIMA L.F.G.; BORGES R.J.; VIVIESCAS M.A.; FERNANDES C.A.H.; FONTES M.R.M. Structural studies with BnSP-7 reveal an atypical oligomeric conformation compared to phospholipases A2-like toxins. **Biochimie**. v. 142, p. 11-21, 2017.

DESJEUX P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 2004; 27(5): 305-318. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cimid.2004.03.004>. PMID:15225981.

DENNIS, E., CAO, J., HSU, Y.-H., MAGRIOTI, V., KOKOTOS, G., 2011. Phospholipase A2 enzymes: physical structure, biological function, disease implication, chemical inhibition, and therapeutic intervention. *Chem. Rev.* 111, 6130–6185.

DENNIS, E.A., 1994. Diversity of group types, regulation, and function of phospholipase A2. *J. Biol. Chem.* 269, 13057–13060.

DJORDJEVIC, J.T., 2010. Role of phospholipases in fungal fitness, pathogenicity, and drug development - lessons from *Cryptococcus neoformans*. *Front. Microbiol.* 1, 1-13. doi:10.3389/fmicb.2010.00125

DOS SANTOS, J. I.; SOARES, A. M.; Fontes, Comparative structural studies on Lys49-phospholipases A2 from *Bothrops* genus reveal their myotoxic site, **J. Struct. Biol.** v. 167 p. 106–116, 2009.

FENG, H., WANG, B., TAN, L., CHEN, N., WANG, N., CHEN, B. Polypyrrole/hexadecylpyridinium chloride-modified graphite oxide composites: Fabrication, characterization, and application in supercapacitors. **Journal of Power Sources**, v. 246, p.621- 628, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.jpowsour.2013.08.002>

FERNANDES, C. A. H.; COMPARETTI, E. J.; BORGES, R. J.; HUANCHUIREVEGA, S.; PONCE-SOTO, L. A.; MARANGONI, S.; Structural bases for a complete myotoxic mechanism: Crystal structures of two non-catalytic phospholipases A2-like from *Bothrops* brazilian venom, **Biochim. Biophys. Acta** v. 1834 p. 2772–2781, 2013.

FLAMMERSFELD, A., LANG, C., FLIEGER, A., & PRADEL, G. (2018). Phospholipases during membrane dynamics in malaria parasites. **International Journal of Medical Microbiology**, 308(1), 129–141. doi:10.1016/j.ijmm.2017.09.015

FLIEGER, A.; GONG, S.; FAIGLE, M.; STEVANOVIC, S.; CIANCOTTO, N. P.; NEUMEISTER, B.; **Journal of Bacteriology**, v. 183 p. 2121–2124, 2001.

FLORES-DÍAZ, M., MONTURIOL-GROSS, L., NAYLOR, C., ALAPE-GIRÓN, A., FLIEGER, A., 2016. Bacterial Sphingomyelinases and Phospholipases as Virulence Factors. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 80, 597-628. doi:10.1128/MMBR.00082-15

FUNK, C. D.; Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology, *Science*. v. 294 p. 1871–1875, 2001.

FRANCIS, B. Myotoxin II from *Bothrops asper* (terciopelo) venom is a lysine-49 phospholipase A2. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. v. 284, n. 2, p.352- 359,1991.

GARCIA DENEGRI, M.E., ACOSTA, O.C., HUANCAHUIRE-VEJA, S., MARTINS-DE-SOUZA, D., MARANGONI, S., MARUÑAK, S.L., TEIBLER, G.P., LEIVA, L.C., PONCE-SOTO, L.A., 2010. Isolation and functional characterization of a new acidic PLA2 Ba SpII RP4 of the *Bothrops alternatus* snake venom from Argentina. **Toxicon** 56, 64–74.

GRIGGS, C. S.; MEDINA, V. F. Graphene and graphene oxide membranes for water treatment. 11^a Edição. **McGraw Hill Encyclopedia of Science & Technology**, 2016.

GRIFFIN, G.; STRATIS-CULLUM, D. Biosensors. In: SCHAECHTER, M. (ed.) *Encyclopedia of Microbiology* (Third Edition). Academic Press, 2009, p. 88-103.

GRUPPI, A.; CERB'AN, F. M.; VOTTERO-CIMA, E.; "Exoantigens from *Trypanosoma cruzi* contain cruzipain," **Acta Tropica**, v. 63, n. 2-3, p. 141–149, 1997.

GUEDES, A. C. M.; CARVALHO, M. L. R.; MELO, M.N.; Leishmaiose tegumentar americana: apresentação pouco comum. *Anais Brasileiro Dermatologia*. v. 83 p. 445-449, 2008.

HATTA, H.; TSUDA, K.; AKACHI, S.; KIM, M.; YAMAMOTO, T. Productivity and some properties of egg yolk antibody (IgY) against human rotavirus compared with 111 rabbit IgG. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v.57, n.3, p.450-454, 1993.

ISTIVAN, T.S.; COLOE, P.J. Phospholipase A in gram negative bacteria and its role in pathogenesis. **Microbiology**. v.152, p.1263–1274, 2006.

KOVACS-NOLAN, J.; MINE, Y. Egg yolk antibodies for passive immunity. *Annual Review of Food Science and Technology*, v.3, n.12, p.163-182, 2012.

HIGUCHI, D. A.; BARBOSA, C. M. V.; BINCOLETTI, C.; CHAGAS, J. R.; MAGALHAES, A.; RICHARDSON, M.; SANCHEZ, E. F.; PESQUERO, J. B.; ARAUJO, R. C.; PESQUERO, J. L. Purification and partial characterization of two phospholipase A2 from *Bothrops leucurus* (white-tailed-jararaca) snake venom. **Biochemie**, v. 89, p. 319-328, 2007.

KINDT, T.J.; GOLDSBY, R.A.; OSBORNE, B.A. Kuby: **Immunology**, 6th edition. W.H. Freedman and Company, New York, p.574, 2007

KINI, R. M.; Excitement ahead: structure, function and mechanism of snake venom phospholipase A2 enzymes. **Toxicon**, v. 42, p. 827-840, 2003.

KUHLE, K., FLIEGER, A., 2013. Legionella phospholipases implicated in virulence. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 376:175-209. doi: 10.1007/82_2013_348

KYTE, J.; DOOLITTLE, R.F. A simple method for displaying the hydrophobic character of a protein, **J. Mol. Biol.** v.157, p.105–132, 1982.

LEE, J.H.; PARK, S.J.; CHOI, J.W. Electrical Property of Graphene and Its Application to Electrochemical Biosensing. **Nanomaterials**, v.9, p.297-301, 2019.

LESLIE, G. A.; CLEM, L. W.; Phylogeny of immunoglobulin structure and function, *J. Exp. Med.* v. 130 p. 1337–1352, 1969.

LESSA, M.M.; LESSA, H. Á.; CASTRO, T. W. N.; OLIVEIRA, A.; SCHERIFER, A.; MACHADO, P.; Mucosal leishmaniasis: epidemiological and clinical aspects. **Braz J Otorhinolaryngol.** v. 73 p. 843-847, 2007.

LOMONTE, B.; ANGULO, Y.; SANTAMARÍA, C. Comparative study of synthetic peptides corresponding to region 115-129 in Lys49 myotoxic phospholipases A₂ from snake venoms. **Toxicon**, v. 42, p. 307-312, 2003.

MAIA C, CAMPINO L. 2008. Methods for diagnosis of canine leishmaniasis and immune response to infection. **Vet Parasitol.** 158, 274–287.

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

MEHRVAR, M.; ABDI, M. Recent developments, characteristics, and potential applications of electrochemical biosensors. **Analytical sciences**, v. 20, n. 8, p. 1113-1126, 2004.

MICHAEL, A.; MEENATCHISUNDARAM, S.; PARAMESWARI, G.; SUBBRAJ, T.; SELVAKUMARAN, R.; RAMALINGAM, S.; Chicken egg yolk antibodies (IgY) as an alternative to mammalian antibodies, **Indian J. Sci. Technol.** v. 3 p. 468–474, 2010.

MORAES, C. S. et. al. Série em biologia celular e molecular: Métodos experimentais no estudo de proteínas. Fundação Oswaldo Cruz – Fiocruz, Rio de Janeiro, 2013.

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

NÚÑEZ, C. E.; ANGULO, Y.; LOMONTE, B. Identification of the myotoxic site of the Lys49 phospholipase A₂ from *Agkistrodon piscivorus piscivorus* snake venom: synthetic C-terminal peptides from Lys49, but not from Asp49 myotoxins, exert membrane-damaging activities. **Toxicon**. v. 39, p. 1587-1594, 2001.

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

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

OPPERDOES, F. R.; VAN ROY, J. “The phospholipases of *Trypanosoma brucei* bloodstream forms and cultured procyclics,” **Molecular and Biochemical Parasitology**, vol. 5, no. 5, pp. 309– 319, 1982.

OWNBY, C. L.; SELISTRE DE ARAUJO, H. S.; WHITE, S. P.; FLETCHER, J. E. Lysine 49 phospholipase A₂ proteins. **Toxicon**, v. 37, p. 411-445, 1999.

PASSERO, L. F. D.; LAURENTI, M. D.; TOMOKANE, T. Y.; CORBETT, C. E. P.; AND TOYAMA, M. H.; The effect of phospholipase A₂ from *Crotalus durissus collilineatus* on *Leishmania (Leishmania) amazonensis* infection. **Parasitology Research**, v. 102, p. 1025–1033, 2008.

PAWLOWIC, M. C.; ZHANG, K. *Leishmania* parasites possess a platelet-activating factor acetylhydrolase important for virulence, **Molecular & Biochemical Parasitology**. v.186, p.11– 20, 2012.

PERUMAL, V.; HASHIM, U. Advances in biosensors: Principle, architecture and applications. **Journal of Applied Biomedicine**, v. 12, n. 1, p. 1–15, 2014.

PETAN, T.; KRIZAJ, I.; PUNGERCAR, J. Restoration of enzymatic activity in a Ser49 phospholipase A₂ homologue decreases its Ca²⁺ -independent membranedamaging activity and increases its toxicity. **Biochemistry** v. 46, p. 12795–12809, 2007.

POLLOK, R. C. G.; MCDONALD, V.; KELLY, P.; Farthing, “The role of *Cryptosporidium parvum*-derived fosfolipase in intestinal epithelial cell invasion,” **Parasitology Research**, v. 90 p. 181–186, 2003.

PONTES, M.C.Q. Estudo dos Vetores da Leishmaniose na região fitogeográfica de Saquarema, Estado do Rio de Janeiro. [Monografia]. Rio de Janeiro: Faculdade São José. 2008.

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

RITMEIJER K, MELAKU Y, MUELLER M, KIPNGETICH S, O’KEEFFE C, DAVIDSON RN. (2006.). Evaluation of a new recombinant K39 rapid diagnostic test for Sudanese visceral leishmaniasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 74, 76–80.

RODOVALHO, V. R. Desenvolvimento de bioeletrodos para detecção da Proteína C Reativa e do gene MYCN, Universidade Federal de Uberlândia - Monografia defendida no curso de Bacharelado em Biotecnologia, Cidade: Uberlândia, 64 fls, 2014.

RODRIGUES V.M., SOARES A.M, MANCIN A.C., FONTES M.R., HOMSI-BRANDEBURGO M.I., GIGLIO J.R. Geographic variations in the composition of myotoxins from *Bothrops neuwiedi* snake venoms: biochemical characterization and biological activity. **Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol**. v. 121, p. 215-22, 1998.

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

RYAN JR, SMITHYMAN AM, RAJASEKARIAH G-H, HOCHBERG L, STITELER JM, MARTIN SK. (2002). Enzyme-linked immunosorbent assay based on soluble promastigote antigen 126 detects immunoglobulin M (IgM) and IgG antibodies in sera from cases of visceral and cutaneous leishmaniasis. **J. Clin. Microbiol.** 40, 1037–1043.

SCHADE, R.; CALZADO, E. G.; SARMIENTO, R.; CHACANA, P. A.; PORANKIEWICZ-ASPLUND, J.; TERZOLO, H. R.; Chicken egg yolk antibodies (IgY-technology): a review of progress in production and use in research and human and veterinary medicine. **Altern Lab Anim** v. 33 p. 129–154, 2005.

SCHALOSKE, R. H.; DENNIS, E. A. The phospholipase A₂ superfamily and its group numbering system. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1761, p. 1246–1259, 2006.

SCOTT, D.L.; WHITE, S.P.; OTWINOWSKI, Z.; YUAN, W.; GELB, M.H.; SIGLER, P.B. Interfacial catalysis: the mechanism of phospholipase A₂. **Science**. v.250 p.1541–1546, 1990.

SINGH S, SIVAKUMAR. (2003). Recent advances in the diagnosis of leishmaniasis. **J. Postgrad. Med.** 49(1), 55-60.

SINGH, S. B., A. S. DAVIS, G. A. TAYLOR, AND V. DERETIC. Human IRGM induces autophagy to eliminate intracellular mycobacteria. **Science**. v.313 p.1438– 1441, 2006.

SIX, D. A.; DENNIS, E. A. The expanding superfamily of phospholipase A(2) enzymes: classification and characterization. **Biochim. Biophys. Acta** v. 1488, p. 1–19, 2000.

SOARES, A.M., FONTES, M.R.M., GIGLIO, J.R. Phospholipases A₂ myotoxins from *Bothrops* snake venoms: structure–function relationship. **Curr. Org. Chem.** v. 8, p. 1677–1690, 2004.

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

SPATARU, T., MARCU, M., BANU, A., ROMAN, E., SPATARU, N. Electrodeposition of platinum on polytyramine modified electrodes for electrocatalytic applications. **Electrochimica Acta**, v. 54, p.3316–3319, 2009.
<https://doi.org/10.1016/j.electacta.2008.12.050>

STEPHENS, W. W.; WALKER, J. L.; MYERS, W. J.; **Pathol. Bacteriol.** v. 5 p. 279- 301, 1898.

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

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

WIMLEY, W.C.; WHITE, S.H. Experimentally determined hydrophobicity scale for *Listeria monocytogenes* and preliminary evaluation of its potential for food preservation, **J. Sci. Food Agric.** v. 91 p. 1946–1950, 2011.

THÉVENOT, D. R.; TOTH, K.; DURST, R. A.; WILSON, G. S. Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 16, p. 121-131, 2001.

TSUBOI, K.; SUGIMOTO, A.; ICHIKAWA, Y.; Prostanoid receptor subtypes, **Prostaglandins Other Lipid Mediators**. v. 68–69 p. 535–556, 2002.

WORLD HEALTH ORGANIZATION WHO. Leishmaniasis in high-burden countries: an epidemiological update based on data reported in 2014. *Wkly Epidemiol Rec* 2016; 91(22): 286-296. PMID:27263128.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Leishmaniasis: disease information. [citado 2020 FEVEREIRO]. Disponível em: <https://www.who.int/leishmaniasis/disease/en/>

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

ZOUARI-KESSENTINI R, LUIS J, KARRAY A, et al. Two purified and characterized phospholipases A₂ from *Cerastes cerastes* venom, that inhibit cancerous cell adhesion and migration. **Toxicon**. 2009.

ZHANG, X.; CALVERT, R.A.; SUTTON, B.J.; DOR, K.A. IgY: a key isotype in antibody evolution. **Biological Reviews**. v.5, p.1-14, 2017.