



UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS - UFT
CAMPUS ARAGUAÍNA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SANIDADE ANIMAL E SAÚDE
PÚBLICA NOS TRÓPICOS – PPGSASPT

JOSEANE RODRIGUES MONTEIRO

**APLICAÇÃO DE IMUNOSSENSOR PIEZOELÉTRICO PARA
IDENTIFICAÇÃO DE ANTICORPOS CONTRA *Leishmania*
infantum EM SORO FELINO**

Araguaína-TO
2021

JOSEANE RODRIGUES MONTEIRO

**APLICAÇÃO DE IMUNOSSENSOR PIEZOELÉTRICO PARA
IDENTIFICAÇÃO DE ANTICORPOS CONTRA *Leishmania*
infantum EM SORO FELINO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Sanidade Animal e Saúde Pública nos Trópicos como quesito para obtenção do título de Mestre em Sanidade Animal e Saúde Pública avaliada pelo orientador e pela Banca Examinadora.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Katyane de Sousa Almeida
Coorientadora: Prof^ª. Dr^ª. Helcileia Dias Santos

Araguaína-TO
2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Tocantins

M775a Monteiro, Joseane Rodrigues.

Aplicação de imunossensor piezoelétrico para identificação de anticorpos contra *Leishmania infantum* em soro felino. / Joseane Rodrigues Monteiro. – Araguaína, TO, 2021.

63 f.

Dissertação (Mestrado Acadêmico) - Universidade Federal do Tocantins – Câmpus Universitário de Araguaína - Curso de Pós-Graduação (Mestrado) em Sanidade Animal e Saúde Pública nos Trópicos, 2021.

Orientadora : Katyane de Sousa Almeida

Coorientadora : Helcileia Dias Santos

1. Biossensor. 2. Gato. 3. Imunodiagnóstico. 4. Leishmaniose Felina. I. Título

CDD 636.089

TODOS OS DIREITOS RESERVADOS – A reprodução total ou parcial, de qualquer forma ou por qualquer meio deste documento é autorizado desde que citada a fonte. A violação dos direitos do autor (Lei nº 9.610/98) é crime estabelecido pelo artigo 184 do Código Penal.

Elaborado pelo sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFT com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

JOSEANE RODRIGUES MONTEIRO

APLICAÇÃO DE IMUNOSSENSOR PIEZOELÉTRICO PARA
IDENTIFICAÇÃO DE ANTICORPOS CONTRA *Leishmania infantum*
EM SORO FELINO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Sanidade Animal e Saúde Pública nos Trópicos da Universidade Federal do Tocantins. Foi avaliada para obtenção do título de Mestre em Sanidade Animal e Saúde Pública nos Trópicos e aprovada em sua forma final pelo orientador e pela Banca Examinadora.

Data de aprovação: 13 / 08 / 2021

Banca Examinadora



Profª Drª Katyane de Sousa Almeida
Universidade Federal do Tocantins



Profº Drº Marco Augusto Giannoccaro da Silva
Universidade Federal do Tocantins



Profª Drª Samara Rocha Galvão
Universidade Federal do Tocantins

*Dedico a minha avó paterna Maria Rita in
memoriam.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Divino Mestre pelo dom da vida e saúde para pleitear essa jornada da tão sonhada Pós-graduação *stricto sensu*. Obrigada pelo auxílio oportuno e presença real em todos os momentos.

Agradeço a todos que colaboraram na elaboração e desenvolvimento deste estudo, e acrescento que foram muitos colaboradores e de diferentes maneiras; alguns próximos outros distantes, alguns direta outros indiretamente, mas todos com igual propósito: obtenção de êxito na execução da pesquisa, e conseguimos, muito obrigada. Ressalto que os agradecimentos foram feitos genericamente com o único propósito de não esquecer nenhum dos que colaboraram, porém direciono minha gratidão e estima de forma individual a você que nos ajudou de alguma forma a realizar este trabalho. Muito obrigada.

RESUMO

O diagnóstico da leishmaniose felina continua sendo um desafio para a saúde pública, incluindo a falta de protocolos específicos para gatos. A aplicação de biossensores como ferramenta analítica tem sido uma alternativa favorável. Assim este estudo propôs o desenvolvimento de um imunossensor piezoelétrico para detecção qualitativa de anticorpos *anti-antígeno A2* de *Leishmania infantum* em soro felino. Foi usado como antígeno a proteína recombinante A2 de *L. infantum* e como amostra, soro felino sabidamente positivo. A microbalança de cristal de quartzo com monitoramento de dissipação foi utilizada para a realização dos testes a partir de dois protocolos de imobilização: adsorção simples e monocamada auto-organizada (SAM) do tipo tiol implementada por dissulfeto de carbono (CS₂). As medidas nanogravimétricas foram realizadas por meio de um software específico gerando um gráfico em tempo real. A resposta analítica de cada imunossensor foi avaliada por meio da variação da frequência em função do tempo antes e após a adição da amostra. A capacidade de biorreconhecimento do imunossensor foi testada incubando amostra de soro felino positiva para leishmaniose visceral, sendo considerada positiva no imunossensor por meio da diminuição da frequência de ressonância do sensor. Os resultados obtidos pela análise da reatividade dos imunossensores elaborados tanto por adsorção simples quanto por SAM mediada por CS₂, demonstraram padrão de resposta indicativo de detecção de anticorpos anti-antígeno A2 presente em soro felino a partir da imobilização de antígeno recombinante A2 de *L. infantum*, gerando perspectivas quanto ao potencial para aplicação na triagem de amostras sorológicas de *gatos* em áreas endêmicas, podendo ajudar a compreender a participação desses na epidemiologia da leishmaniose visceral e, conseqüentemente, contribuir para seu monitoramento e controle, sendo uma ferramenta promissora para auxiliar estudos epidemiológicos e diagnósticos clínicos da doença em felinos.

Palavras-chaves: Biossensor. Gato. Imunodiagnóstico. Leishmaniose Visceral Felina.

ABSTRACT

The diagnosis of feline leishmaniasis remains a public health challenge due to the lack of specific protocols for cats. The application of biosensors as an analytical tool has been a favorable alternative. Thus, this study proposed the development of a piezoelectric immunosensor for the qualitative detection of anti-*Leishmania infantum* A2 antigen antibodies in feline serum. Recombinant protein A2 from *L. infantum* was used as antigen and feline serum known to be positive was used as a sample. A quartz crystal microbalance with dissipation monitoring was used to carry out the tests based on two immobilization protocols: simple adsorption and self-assembled monolayer (SAM) of the thiol type implemented by carbon disulfide (CS₂). Nanogravimetric measurements were performed using specific software, generating a real-time graph. The analytical response of each immunosensor was evaluated by varying the frequency as a function of time before and after the addition of the sample. The biorecognition capacity of the immunosensor was tested by incubating a feline serum sample positive for visceral leishmaniasis, being considered positive in the immunosensor by decreasing the sensor's resonance frequency. The results obtained by the analysis of the reactivity of immunosensors prepared by both simple adsorption and CS₂-mediated SAM demonstrated a pattern of response indicative of detection of anti-A2 antigen antibodies present in feline serum from the immobilization of *L. infantum* recombinant A2 antigen, generating perspectives on the potential for application in the screening of serological samples of cats in endemic areas, which may help to understand their participation in the epidemiology of visceral leishmaniasis and, consequently, contribute to its monitoring and control, being a promising tool to support epidemiological and diagnostic studies of the disease in felines.

Key-words: Biosensor. Cat. Feline Visceral Leishmaniasis. Immunodiagnosis.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Componentes estruturais de um biossensor.	24
Figura 2- Esquema ilustrativo de Microbalança de Cristal de Quartzo (QCM). a) Cristal de quartzo; b) Fluxo da ação dos cristais piezoelétricos; c) Gráfico formado pela variação da frequência do cristal de quartzo em função do tempo.	27
Figura 3- Representação estrutural de Monocamadas Auto-organizadas (SAM) sobre substrato de ouro.	30
Figura 4- Princípio de funcionamento dos imunossensores piezoelétricos: (a) para detecção de antígeno; (b) para detecção de anticorpo.	31
Figura 5 - Cristal de Quartzo revestido de ouro. a) frente e verso; b) frente; c) verso.	35
Figura 6- Sequência de montagem da microbalança de cristal de quartzo (QCM). a) Câmara de reação com o cristal de quartzo acoplado; b) QCM-D; c) Computador operando com o software OpenQCM-Q1.	36
Figura 7- Preparação do sensor de cristal de quartzo (QCM). a) Lavagem com solução “piranha”; b) Lavagem com água ultrapura; c) Imersão dos sensores em álcool metílico em câmara úmida sob agitação; d) Secagem espontânea em temperatura ambiente.	37
Figura 8 - Representação esquemática da elaboração do imunossensor piezoelétrico por adsorção do antígeno na superfície do cristal de quartzo revestido de ouro. a e b) Etapas de preparação do sensor; c) Imobilização do antígeno (proteína recombinante A2 de <i>Leishmania infantum</i> a 0,1mg/ml); d) Bloqueio com solução de albumina de soro bovino (BSA); e) Adição de soro felino positivo (anticorpos); f) Demonstração de leitura do teste.	38
Figura 9- Diagrama esquemático da elaboração do imunossensor por Monocamadas Auto-organizadas (SAM) tipo Au-CS ₂ -rA2. a) Imersão do sensor em solução aquosa de dissulfeto de carbono (CS ₂) a 0,1M; b) Adição do antígeno A2 de <i>Leishmania infantum</i> com a efetivação da ligação covalente pelo grupo reativo da amina do antígeno rA2 com os terminais de carbono do CS ₂ ; c) Adição de soro felino positivo (anticorpos) se ligando ao antígeno.	40
Figura 10- Resposta analítica do imunossensor tipo Au-A2 por adsorção simples monitorada em tempo real por QCM-D.	42
Figura 11- Resposta analítica do imunossensor tipo Au-CS ₂ -A2 monitorada em tempo real por QCM-D.	46
Quadro 1- Sinais clínicos em gatos infectados por <i>Leishmania</i> spp. em vários estados do Brasil.	19
Quadro 2- Classificação dos biossensores com base no biorreceptor e no transdutor.	25

LISTA DE ABREVIATURAS

A2	Antígeno A2 (Antígeno de <i>Leishmania infantum</i>)
Ac	Anticorpos
Ag	Antígenos
AS	Ácido Siálico
BSA	Albumina de Soro Bovino
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
CN	Celulose Bacteriana
D	Dissipação
ELISA	Ensaio Imunoenzimático
f	Frequência
FeLV	Vírus da Leucemia Felina
FIV	Vírus da Imunodeficiência Felina
HÁ	Hemaglutinina
HBsAg	Antígeno de superfície da Hepatite B
IFAT	Teste de Imunofluorescência
IgGNS1	Imunoglobulina G monoclonal da proteína Não Estrutural 1 (do vírus da dengue)
LV	Leishmaniose Visceral
MA	Maranhão
MG	Minas Gerais
MS	Mato Grosso do Sul
MT	Mato Grosso
NS1	Proteína Não Estrutural 1 (do vírus da dengue)
PA	Pará
PB	Paraíba
PBS	Tampão fosfato-salino (do inglês phosphate buffered saline)
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PE	Pernambuco
PfHRP-2	Proteína-2 rica em histidina (antígeno do <i>Plasmodium falciparum</i>)
PI	Piauí
QCM	Microbalança de Cristal de Quartzo (do inglês <i>Quartz-Cristal Microbalance</i>)
QCM-D	Microbalança de Cristal de Quartzo com monitoramento de Dissipação (do inglês <i>Quartz Crystal Microbalance with Dissipation monitoring</i>)
rA2	Proteína recombinante A2
RIFI	Reação de Imunofluorescência Indireta
RJ	Rio de Janeiro
RN	Rio Grande do Norte
SAM	Monocamadas Auto-organizadas (do inglês <i>Self-Assembled Monolayer</i>)
SP	São Paulo
TO	Tocantins
UFT	Universidade Federal do Tocantins
USB	Universal Serial Bus

LISTA DE SÍMBOLOS

μg	Micrograma
μL	Microlitro
μm	Micrômetro
4-APBA	4-aminofenil borônico
4-APBA-SA	4-aminofenil borônico-ácido siálico
~	Aproximadamente
AT	At the angle (no ângulo)
Au	Ouro
Au-CS2-rA2	Ouro-dissulfeto de carbono-antígeno recombinante A2
AuNP	Nanopartículas de Ouro
Au-rA2	Ouro-antígeno recombinante A2
C	Carbono
cm^2	Centímetro quadrado
COOH	Carboxila
CS ₂	Dissulfeto de carbono
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
H ₂ SO ₄	Ácido Sulfúrico
Hz	Hertz
Kg	Quilograma
KHz	Quilo-hertz
M	Molar
M ³	Metro cúbico
mg	Miligrama
MHz	Megahertz
ml	Mililitro
mm	Milímetro
N	Nitrogênio
ng	Nanograma
NH ₂	Grupo Amina
nm	Nanômetro
°C	Graus Celsius
OH	Hidroxila
pH	Potencial Hidrogeniônico
S	Enxofre
SH	Tiol
Ti	Titânio

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 OBJETIVOS	13
2.1 Objetivo Geral	13
2.2 Objetivos específicos	13
3 REVISÃO DE LITERATURA	14
3.1 Aspectos gerais e biologia das <i>Leishmanias</i> spp.	14
3.2 Leishmaniose Felina	17
3.3 Imunopatogenia	20
3.4 Métodos de Diagnóstico	21
3.5 Biossensores	23
3.5.1 Transdutor Piezoelétrico – Microbalança de Cristal de Quartzo (QCM)	26
3.5.1.1 Imobilização de Biomoléculas	28
3.5.1.2 Imunossensores Piezoelétrico	30
4 MATERIAS E MÉTODOS	34
4.1 Declaração de ética	34
4.2 Proteína Recombinante A2 (rA2) e Soro felino	34
4.3 Descrição da Microbalança de Cristal de Quartzo (QCM)	34
4.4 Preparo da superfície do sensor	36
4.5 Elaboração do imunossensor por adsorção simples tipo Ouro-antígeno recombinante A2 (Au-rA2)	37
4.6 Elaboração do imunossensor por Monocamadas Auto-organizadas (SAM) tipo Ouro-dissulfeto de carbono-antígeno recombinante A2 (Au-CS₂-rA2)	39
4.7 Avaliação da reatividade do sensor	40
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
5.1 Análise da preparação do imunossensor	41
5.2 Análise da capacidade de reconhecimento do imunossensor por adsorção simples tipo Ouro-antígeno recombinante A2 (Au-rA2)	42
5.3 Análise da capacidade de reconhecimento do imunossensor por Monocamadas Auto-organizadas (SAM) tipo Ouro-dissulfeto de carbono-antígeno recombinante A2 (Au-CS₂-rA2)	45
6 CONCLUSÃO	49
REFERÊNCIAS	50
ANEXO A – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA	62

1 INTRODUÇÃO

A leishmaniose é uma enfermidade parasitária de incidência elevada, provocada por protozoários do gênero *Leishmania* spp., que desafia a saúde pública humana e veterinária, principalmente, em países tropicais e subtropicais (CARDOSO et al, 2021). Apesar dos cães serem considerados hospedeiros reservatórios urbanos primários de *L. infantum*, um número crescente de estudos sugere que a leishmaniose afeta muitas outras espécies de animais domésticos e selvagens, sendo entre os mamíferos domésticos, a suscetibilidade de infecção dos gatos amplamente relatada, especialmente, em regiões onde a leishmaniose humana e canina são endêmicas (METZDORF, et al., 2017; DEDOLA et al., 2018; MENDONÇA et al, 2020; AKSULU et al, 2021; CARDOSO et al, 2021).

Em gatos, a leishmaniose foi relatada em várias regiões do globo terrestre, com muitos casos notificados na América do Sul, seguida pela Europa e América do Norte (ASFARAM; FAKHAR; TESHNIZI, 2019; ABRAMO et al, 2021). No Brasil, a leishmaniose felina é prevalente, conforme evidenciado por Oliveira et al. (2020) em sua revisão, ao analisarem os inquéritos epidemiológicos nacionais da infecção em gatos, demonstrando sua ocorrência em mais da metade das unidades federativas, além dos casos naturais, comumente relatados, que estão distribuídos pelo país, inclusive no estado do Tocantins (SOUSA et al, 2019).

Diversas espécies de *Leishmania* spp. foram encontradas infectando felinos ao redor do mundo com destaque para *Leishmania infantum*, presente em mais de 60% dos relatos publicados, até mesmo dentre os realizados no Brasil que, além desta espécie, também apontaram outras duas menos frequentes *L. amazonensis* e *L. braziliensis* (FIGUEIREDO et al, 2016; ASFARAM; FAKHAR; TESHNIZI, 2019; CARNEIRO et al, 2020). A infecção por *Leishmania* sp. em gatos ocorre, principalmente, via vetorial pela picada do flebotômio fêmea infectada, sendo *Lutzomyia longipalpis* a espécie vetora de maior relevância nacional do ponto de vista epidemiológico (AGUIAR; VIEIRA, 2018).

Recentemente, o emprego de técnicas de xenodiagnóstico evidenciaram, não só a participação de gatos como fonte de alimento para flebotômios, como também, a capacidade de felinos naturalmente parasitados por *L. infantum* serem infectantes aos flebotômios, e desses por sua vez, transmitirem o agente infeccioso da leishmaniose para outro hospedeiro suscetível, no caso o cão doméstico, sugerindo um envolvimento mais significativo dos gatos na epidemiologia da doença (MENDONÇA et al, 2020; BATISTA et al, 2020).

No diagnóstico da leishmaniose felina, geralmente aplica-se os mesmos recursos usados na canina como sorologia, citologia, histopatologia, cultura e testes moleculares. No entanto,

apesar das vantagens, cada método possui suas limitações e o desempenho da análise pode sofrer influência de diversas condições, como o tipo de material biológico, os reagentes e o procedimento específico adotado (PENNISI, 2015; ASFARAM; FAKHAR; TESHNIZI, 2019).

A falta de protocolos para o diagnóstico de *Leishmania* spp. em gatos afeta até mesmo as investigações epidemiológicas, uma vez que, a taxa de soropositividade pode sofrer interferência não só de fatores metodológicos, como também do grau de endemicidade e ocorrência de reação cruzada, favorecendo a divergência de resultados de um local para outro, o que inviabiliza a comparação de dados entre estudos distintos, além de possibilitar a subestimação de casos (PENNISI, 2015; COSTA-VAL et al, 2020). Desta forma, é fundamental a busca por ferramentas analíticas que ofereçam alta sensibilidade e especificidade, de baixo custo, com rapidez e praticidade na detecção de agentes patogênicos como *Leishmania* spp., sendo neste aspecto a tecnologia de sensores biológicos muito promissora (RODOVALHO et al., 2015; MARTINS et al, 2020).

O mecanismo básico de um biossensor consiste em transformar a interação biológica dos analitos em um sinal elétrico mensurável, possibilitando por exemplo, no caso de um imunossensor, acompanhar a biointeração antígeno/anticorpo na superfície do sensor em tempo real (SANGEETHA; JULIET, 2014; MARTINS et al, 2020). O sistema de microbalança de cristal de quartzo (QCM) constitui uma opção de biossensor piezoelétrico altamente sensível e rápido, baseado em um detector de massa de superfície ultra-sensível, capaz de realizar medições na unidade de nanograma, que permite detectar e quantificar uma diversidade imensa de biomarcadores, ideal para diagnóstico oportuno e monitoramento de doenças infecciosas (JIN et al, 2017; LIM et al, 2020).

Diante do exposto, considerando à proximidade de convívio dos gatos domésticos com o ser humano e a necessidade de investigação destes animais quanto ao seu papel na cadeia epidemiológica da leishmaniose visceral, é recomendável a padronização de práticas de diagnóstico que favoreçam o rastreamento e vigilância desses animais quanto a infecção por *L. infantum* (FIGUEIREDO et al, 2016). Assim, este estudo propõe o desenvolvimento de um imunossensor piezoelétrico para detecção qualitativa de anticorpos *anti*-antígeno A2 de *L. infantum* em soro felino.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Utilizar um protótipo de imunossensor piezoelétrico para detecção qualitativa de anticorpos *anti*-antígeno A2 de *L. infantum* em soro felino.

2.2 Objetivos específicos

- Verificar o padrão de resposta do imunossensor tipo (Au-rA2), elaborado pelo protocolo de adsorção direta de antígeno recombinante A2 como biomarcador, imobilizado para identificação de anticorpo anti-antígeno A2 de *L. infantum*;
- Verificar o padrão de resposta do imunossensor tipo (Au-CS2-rA2), elaborado pelo protocolo de imobilização orientada de antígeno recombinante A2 como biomarcador, imobilizado para identificação de anticorpo anti-antígeno A2 de *L. infantum*;
- Relacionar o padrão de resposta entre os imunossensores utilizados.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Aspectos gerais e biologia das *Leishmanias* spp.

Em alguns países tropicais e subtropicais, inclusive no Brasil, as leishmanioses pertencem a categoria de patologias com difícil resolução para a Saúde Pública (OLIVEIRA et al, 2020). Possuem como agentes causadores algumas espécies do gênero *Leishmania*, constituído por protozoários parasitas obrigatórios, sendo definidas como enfermidades antroponóticas e zoonóticas com expressões clínicas diversas, desde manifestações cutâneas e mucosas até a leishmaniose visceral (MCGWIRE; SATOSKAR, 2014).

Estes protozoários pertencem à ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae, e a taxonomia aplicada ao longo de décadas para classificar *Leishmania* spp. têm sido baseada principalmente em critérios clínicos, geográficos e epidemiológicos (FERNÁNDEZ-ARÉVALO et al, 2020). Até o momento, sabe-se que o ser humano é suscetível a cerca de 22 espécies do gênero *Leishmania* spp., que se organizam em dois subgêneros: *Leishmania* (*Leishmania*) e *Leishmania* (*Viannia*) (OPAS, 2019).

Nas Américas, constatou-se a distribuição de 12 espécies patogênicas ao ser humano (OPAS, 2020). Em sua etiologia a leishmaniose visceral (LV) apresenta como agente principal *L. (L.) infantum* nas Américas, sendo encontrada em todos os países do continente com registro de casos de leishmaniose visceral humano ou canino (BRASIL, 2017; OPAS, 2020). Já a leishmaniose em sua forma tegumentar está ligada a várias espécies de *Leishmania* spp. largamente distribuídas em todo território americano. No Brasil já foram descritas sete espécies diferentes, sendo três de maior importância: *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis* e *L. (L.) amazonensis* (OPAS, 2019).

Morfologicamente esses parasitos possuem duas formas principais de apresentação em seu ciclo de vida, uma flagelada, extracelular denominada promastigota, presente no tubo digestório do inseto vetor; e outra sem flagelo aparente, intracelular obrigatória, denominada amastigota, encontrada em células fagocíticas mononucleares dos hospedeiros vertebrados (BRASIL, 2014; OPAS, 2020).

As promastigotas possuem um layout celular alongado, com núcleo ovoide e cinetoplasto anterior ao núcleo, apresentando um longo flagelo móvel na região anterior do parasito e extremidade posterior mais afilada, medindo ao todo cerca de 16–40 µm de comprimento. Enquanto as amastigotas apresentam um corpo celular menor, ovoide ou esférico

com núcleo arredondado, ocupando cerca de um terço do corpo do parasito que mede aproximadamente 3-6,5 μm de diâmetro (SILVA et al, 2014).

Dada a ampla variedade de espécies patogênicas para humanos, a ecologia da transmissão da *Leishmania* spp. torna-se bastante complexa, devido a dinâmica nos padrões de distribuição e ciclo de vida do parasito, que envolve um vetor e uma diversidade de espécies de hospedeiros reservatórios variando desde pequenos a grandes mamíferos domésticos e selvagens (ALEMAYEHU; ALEMAYEHU, 2017).

No meio urbano, o cão é considerado o reservatório mais importante para *L. (L) infantum*, porém, a interação entre reservatórios e parasito é complexa, multifatorial, circunstancial e dinâmica, podendo ocorrer uma variação da unidade biológica de acordo com as mudanças do meio ambiente (OPAS, 2019).

Neste aspecto, Cardoso et al. (2021), em revisão recente, relacionaram uma diversidade de hospedeiros, entre os quais bovinos, felinos, ovinos, caprinos e equinos, que foram expostos ou sofreram infecção por *Leishmania* spp., ocupando o gato posição de destaque entre os animais domésticos afetados. No ambiente silvestre, os reservatórios incluem marsupiais, tamanduás, urso-preguiça, raposas e roedores (OPAS, 2019).

A transmissão vetorial constitui a principal forma de transmissão de *Leishmania* spp. para humanos e animais, estando o gato entre as preferências alimentares do vetor (PENNISI, 2015; GONZÁLEZ et al, 2017; MENDONÇA et al, 2020). Normalmente, considera-se, apenas um grupo de insetos vetores para todas as espécies de *Leishmania* spp., os flebotomíneos da subfamília Phlebotominae (COTTON, 2017). A transmissão não vetorial é menos frequente, porém já foi relatada tanto no cão, quanto no ser humano, podendo ocorrer por diversas formas como transfusão de sangue e por via transplacentária, entre outras, no gato, este tipo de transmissão permanece desconhecida (SVOBODOVA et al, 2017; PENNISI; PERSICHETTI, 2018; TANAKA et al, 2020).

Os flebotomíneos apresentam grande diversidade conhecida, sendo descritas, até 2017, cerca de 1000 espécies amplamente distribuídas nas regiões intertropicais e temperadas do mundo (OPAS, 2020; WHO, 2020). Quanto a importância em saúde, dois gêneros se destacam entre as diferentes espécies de flebotomos com participação, suspeita ou já comprovada, na transmissão da leishmaniose: *Phlebotomus* spp. na Europa, África e Ásia e *Lutzomyia* spp. nas Américas (AKHOUNDI et al, 2016).

O Brasil é um dos países que guarda a maior quantidade de espécies conhecidas de flebotomíneo em todo o mundo, sendo o flebotomo *Lutzomyia longipalpis*, o mais importante vetor da leishmaniose visceral no país (AGUIAR; VIEIRA, 2018; BRASIL, 2017). Muitos

estudos têm apresentado a natureza oportunista desta espécie, revelada em sua preferência alimentar bastante eclética por sangue de aves, roedores, humanos, cães, gatos, bois, cavalos e porcos (SALES et al, 2015; GUIMARÃES-E-SILVA et al, 2017; FERREIRA et al, 2018).

Morfologicamente, os flebótomos são insetos pequenos medindo cerca de 2 a 3mm, apresentando em geral, corpo peludo, pernas longas, tórax corcunda e asas bastante lanceoladas em forma de “V” quando em repouso (GALVEZ et al, 2018; OPAS, 2020). Possuem capacidade limitada de voo sendo, normalmente, curto, silencioso e em pequenos saltos, com maior atividade crepuscular e noturna (OPAS, 2019).

As condições de umidade, temperatura e disponibilidade de matéria orgânica podem influenciar no ciclo evolutivo do vetor que passa por quatro fases: ovo, larva, pupa e adulto (BRASIL; BRASIL, 2018). Para garantir o processo reprodutivo completo do vetor, a fêmea costuma realizar sua oviposição em locais ricos em compostos orgânicos, pouca luminosidade, com bom teor de calor e umidade como tocas de certos roedores, cascas de árvores velhas, ruínas, rachaduras nas paredes das casas, abrigos de animais e lixo doméstico (AGUIAR; VIEIRA, 2018; WHO, 2020). Durante a maturação dos ovos, a fêmea necessita de sangue, e ao fazer sua atividade hematófaga em animais infectados, ingere células do sistema imune parasitadas por formas amastigotas do agente causador da leishmaniose (OPAS, 2020).

Imediatamente após a ingestão, as formas amastigotas de *Leishmania* sp. sofrem um processo de diferenciação no trato digestivo do vetor flebotomíneo, assumindo a forma promastigota (PIMENTA et al, 2018). No intestino do vetor, as promastigotas multiplicam-se, por divisão binária, assumindo inicialmente as formas promastigotas procíclicas e, logo depois, chegam à forma infectante ao transformarem-se em promastigotas metacíclicas, que migram para a probóscide do vetor e são inoculadas em um novo hospedeiro vertebrado, no momento da picada (OPAS, 2020).

Outros aspectos estudados no que se refere a compreensão da dinâmica de transmissão dos parasitos causadores desta zoonose, especialmente em áreas endêmicas, estão voltados para aspectos climáticos e ambientais, que vem apresentando tendência linear significativa entre o aumento de variáveis como temperatura, umidade do ar, precipitação, expansão urbana e desmatamento de maneira desordenada e o aumento da densidade e infectividade dos flebotomíneos, resultando em consequente aumento da taxa de incidência da doença (SILVA et al, 2018; GAO; CAO, 2019; REIS et al, 2019).

3.2 Leishmaniose Felina

Os estudos sobre a infecção por *Leishmania* spp. em felinos aumentaram na última década, porém, ainda permanece limitado ao conhecimento baseado em evidências sobre a doença (PENNISI; PERSICHETTI, 2018). Desde o primeiro relato de leishmaniose felina realizado ainda em 1912, por Sergent et al (1912) na Argélia, a investigação da doença em gatos foi realizada em países como Grécia (DIAKOU et al, 2017; CHATZIS et al, 2020), Espanha (MIRÓ et al, 2014; FERNANDEZ-GALLEGO et al, 2020), Turquia (CAN et al, 2016; AKSULU et al, 2021), Irã (MOHEBALI et al, 2017; ASGARI et al, 2020), Itália (DEDOLA et al, 2018; IATTA et al, 2019; SPADA et al, 2020), Venezuela (MONDOLFI et al, 2019), Portugal (PEREIRA et al, 2020; SEQUEIRA, 2021) entre outros.

No Brasil, o primeiro registro de leishmaniose felina retrata o caso de um gato da região do Aurá no Pará, em que o animal apresentava úlceras nas orelhas e no focinho, e a citologia para *Leishmania* spp. foi positiva (MELO, 1940). A partir de então, diversos inquéritos epidemiológicos em gatos têm sido reportados em muitos estados brasileiros, a ponto, do país concentrar o maior número de estudos da doença em felinos nos últimos anos (ASFARAM; FAKHAR; TESHNIZI, 2019; OLIVEIRA et al, 2020).

Até o momento, foram encontradas sete espécies de *Leishmania* spp. acometendo gatos em diferentes locais do mundo: *L. infantum*, *L. mexicana*, *L. venezuelensis*, *L. braziliensis*, *L. amazonensis*, *L. major* e *L. tropica* (PENNISI et al, 2015; AKSULU et al, 2021). A infecção por *L. infantum* é predominante nos felinos, chegando a cerca de 63% dos casos relatados (ASFARAM; FAKHAR; TESHNIZI, 2019). Na literatura, também já foram descritos casos de infecção mista por espécies distintas de *Leishmania* spp., envolvendo *L. infantum* e *L. braziliensis*, *L. infantum* e *L. mexicana*, *L. braziliensis* e *L. mexicana* identificadas em felinos no México e, *L. infantum* e *L. tropica* na Turquia (LONGONI et al, 2012; CAN et al, 2016).

Apesar do aumento no número de relatos nacionais e internacionais envolvendo a investigação de *Leishmania* spp. em felinos, o papel epidemiológico dos gatos na manutenção e transmissão do agente causador da leishmaniose ainda se encontra em fase primária de aprendizagem (PENNISI; PERSICHETTI, 2018; BATISTA et al, 2020).

Deste modo, a atuação dos gatos domésticos na dinâmica da leishmaniose tem dividido opiniões no meio científico, sendo apontados como hospedeiros acidentais, reservatórios alternativos e reservatórios secundários para o parasito causador da doença, pelo menos em áreas endêmicas (MAIA et al, 2010; MIGLIAZZO et al, 2015; MOHEBALI et al, 2017; ASFARAM; FAKHAR; TESHNIZI, 2019; OLIVEIRA et al, 2020;). Contudo, abordagens

recentes sugerem que a participação dos felinos pode ser epidemiologicamente mais relevante, ao demonstrarem, por xenodiagnóstico, a capacidade de gatos infectados por *L. infantum* infectarem seu vetor biológico, *L. longipalpis*, atuando como reservatório da doença (MENDONÇA et al, 2020). Outro estudo, mostra ainda, a transmissão experimental da infecção por *L. infantum* de um gato doméstico, naturalmente infectado, para um cão doméstico, livre de infecção, por meio de flebotômíneos da espécie *L. longipalpis* criados em laboratório (BATISTA et al, 2020).

Um aspecto significativo, neste contexto, está voltado para o fato do flebotômíneo ser encontrado com predominância em áreas periurbanas e possuir capacidade adaptativa a várias condições climáticas e habitats, tendo como fonte de alimento animais de diferentes espécies, entre os quais, o gato demonstrou ter elevada atratividade alimentar para o vetor (BOUTSINI et al., 2018; ROCHA et al, 2019; BATISTA et al, 2020).

Assim, os felinos positivos para *Leishmania* spp. podem apresentar-se assintomáticos ou com sinais clínicos discretos ou inespecíficos, podendo ser confundidos com outras patologias comuns em felinos domésticos (SANTOS et al, 2018). Desta forma, quando presentes, os achados clínicos da leishmaniose em gatos englobam, principalmente, o aumento dos linfonodos e alterações cutâneas, as quais, incluem lesões ulcerativas ou nodulares, dérmicas ou de mucosas, encontradas geralmente, na região da cabeça do animal, afetando pálpebras, focinho, orelhas e lábios, ou nas partes distais dos membros, alopecia e de forma esporádica, dermatite esfoliativa (PENNISI et al, 2015; METZDORF et al, 2017; FERNANDEZ-GALLEGO et al, 2020).

Podem ocorrer ainda lesões oculares, sendo comum a uveíte e a conjuntivite, além da gengivoestomatite relatada em vários estudos (METZDORF et al, 2017; MADRUGA et al, 2018; SANTOS et al, 2018). Os sinais inespecíficos descritos incluem emagrecimento, febre, diarreia, apetite reduzido e letargia (PENNISI et al, 2015; FERNANDEZ-GALLEGO et al, 2020). O Quadro 1 apresenta alguns dos sinais clínicos descritos em diversos estudos com felinos infectados realizados em diferentes estados brasileiros.

As manifestações cutâneas comumente encontradas em gatos com leishmaniose por *L. infantum*, podem indicar elevada carga parasitária na pele e, portanto, potencial de infecção do vetor (MENDONÇA et al, 2020). A ausência desses sinais não exclui a possibilidade de infecção em gatos, pelo contrário, existe relatos de animais sorologicamente positivos sem nenhum sinal clínico detectado, dificultando ou retardando o diagnóstico (ALVES-MARTIN et al, 2017). É importante lembrar que embora os achados clínicos mais frequente sejam as

lesões cutâneas da pele ou da mucosa, a leishmaniose felina também é vista como uma enfermidade sistêmica, assim como a canina (PENNISI, 2015; ABRAMO et al, 2021).

Quadro 1- Sinais clínicos em gatos infectados por *Leishmania* spp. em vários estados do Brasil

LEISHMANIOSE FELINA			
UF	Espécie	Sinais Clínicos	Referência
MA	<i>L. infantum</i>	Alopecia, cabelo rarefeito, lacerações e dermatite ulcerativa	ROCHA et al. (2019)
MG	<i>L. infantum</i>	Aumento dos linfonodos poplíteos, dermatite furfuracea, onicogribose, caquexia com atrofia muscular, fadiga, anorexia, fraqueza e ferida próxima à pavimentação esquerda	SILVA et al. (2010)
MS	<i>Leishmania</i> spp.	Úlcera, complexo gengivite/estomatite e perda de peso	METZDORF et al. (2017)
MT	<i>L. infantum</i>	Lesões cutâneas ulcerativas no plano nasal e na orelha e onicogribose	HEADLEY et al. (2019)
PA	<i>L. amazonensis</i>	Lesões nodulares nas orelhas	CARNEIRO et al. (2020)
PB	<i>L. infantum</i>	Lesões cutâneas multicêntricas, nodulares e ulceradas; mau estado corporal, desidratação, pelos opacos e danificados, dificuldade respiratória e lesões nodulares não ulceradas nas extremidades das orelhas, focinho e pálpebra	SILVA et al. (2020)
PE	<i>L. infantum</i>	Lesões cutâneas	SILVA et al. (2014)
PI	<i>L. infantum</i>	Linfonodos aumentados, alopecia, lesões cutâneas, perda de peso, nódulos cutâneos, uveíte, blefarite, desidratação e secreção ocular	MENDONÇA et al. (2020)
RJ	<i>L. (V.) braziliensis</i>	Lesões de pele	FIGUEIREDO et al. (2016)
RN	<i>Leishmania</i> spp.	Gengivostomatite, broncopneumonia, linfadenomegalia, carcinoma de células escamosas na borda nasal e palpebral, rinite crônica, blefarite bilaterais, lesões em placa ulcerada com difícil cicatrização, doença renal crônica, alopecia, eritema e descamação nas bordas das orelhas, doença renal crônica e abscesso cutâneo	BEZERRA et al. (2019)
SP	<i>L. infantum</i>	Hiporexia e apatia	SILVA (2019)
TO	<i>L. infantum</i>	Sinais de diarreia, febre, hiporexia e apatia	SOUSA et al. (2019)

MA: Maranhão, MG: Minas Gerais, MS: Mato Grosso do Sul, MT: Mato Grosso, PA: Pará, PB: Paraíba, PE: Pernambuco, PI: Piauí, RJ: Rio de Janeiro, RN: Rio Grande do Norte, SP: São Paulo, TO: Tocantins.

A manifestação clínica da leishmaniose felina pode ser favorecida por condições de debilidade do sistema imunológico ocasionado por causas diversas, incluindo coinfeção com outras doenças como FIV (Vírus da Imunodeficiência Felina) e FeLV (Vírus da Leucemia Felina), terapia imunossupressora e patologia grave coexistente, como neoplasia maligna (PENNISI, 2015). Deste modo, as coinfeções ou comorbidades podem provocar alterações nos achados clínicos e nos padrões laboratoriais, interferir na intensidade da parasitemia ou no desenvolvimento da leishmaniose felina (SPADA et al, 2020).

Embora sejam geralmente assintomáticos ou subclínicos, estudos epidemiológicos envolvendo gatos que vivem em áreas onde *Leishmania* spp. é endêmica, apresentam riscos de exposição e prevalência semelhantes à dos cães na mesma região (OTRANTO et al, 2017; IATTA et al, 2019). Contudo, a falta de procedimentos padronizados para o diagnóstico oportuno da infecção por *L. infantum* em gatos pode resultar na subestimação do número verdadeiro de casos e contribuir para grande variação nas taxas de prevalência, frequentemente, observada entre muitos estudos realizados em diferentes populações de felinos, comprometendo a comparação dos dados disponíveis (SOARES; DUARTE; SOUSA, 2015; IATTA et al, 2019).

Outro fator preocupante está voltado para a capacidade dos gatos de manterem a parasitemia elevada por longo período, mesmo sem sinal clínico visível, favorecendo, aos felinos, o potencial de reservatórios na transmissão do parasito a outros animais e humanos, destacando a necessidade de padronização e rapidez no diagnóstico para detecção e monitoramento dos felinos infectados, bem como para compreender a atuação dos gatos na manutenção e transmissão de *Leishmania* spp. (AKHTARDANESH et al, 2018; IATTA et al, 2019; AKSULU et al, 2021).

Assim, a leishmaniose felina causada por *L. infantum* é considerada uma doença emergente em gatos e por acontecer, especialmente, por transmissão vetorial, aliado ao aumento crescente da população de felinos de companhia e de rua, é recomendável, a vigilância contínua para melhor monitoramento da leishmaniose em gatos, principalmente, dos que vivem ou visitaram áreas endêmicas. Além disso, uma maior atenção por parte dos profissionais quanto a susceptibilidade desses animais à infecção, como também a inclusão da leishmaniose visceral no diagnóstico diferencial, na adoção de medidas preventivas e no monitoramento de possível disseminação da infecção (PENNISI, 2015; PIMENTA et al, 2015; PENNISI; PERSICHETTI, 2018; BRIANTI et al, 2019; AKASULU et al, 2021).

3.3 Imunopatogenia

A LVH é uma doença que afeta diferentes órgãos do sistema imune e por isto possui uma imunopatogênese bastante complexa, resultando em alterações patológicas em muitos órgãos. Os parasitos desenvolveram estratégias para superar a resposta imune do hospedeiro por meio dos fatores de virulência, que modificam a produção de interleucinas e as funções dos macrófagos, resultando em alterações fisiológica e histopatológica, que se agravam com o decorrer da doença (HARHAY et al., 2011; OLIVIER; ZAMBONI, 2020).

A dispersão e multiplicação incontrolada do parasito decorre de uma supressão reversível e específica da imunidade mediada por células na qual é determinada na presença da *Leishmania* spp. Deste modo, apenas uma pequena parte de indivíduos infectados desenvolve a sintomatologia da doença. Em indivíduos que não desenvolvem a doença, observa-se que os exames de imunidade celular ou humoral continuam reativos por longo período o que ocorre quando se tem a presença de antígenos, podendo-se concluir que *Leishmania* spp. ou alguns de seus antígenos permanecem presentes no organismo infectado durante um longo tempo, depois da infecção inicial (BRASIL, 2014).

Pennisi (2015) pontua ser diferente a resposta imunológica nos cães e felinos, o que corrobora o entendimento de Costa et al. (2010), ao afirmarem que a resposta imunológica explica apenas um reduzido número de felinos apresentarem-se infectados e sintomáticos (FONSECA et al., 2013). Em um estudo sobre o papel do felino na epidemiologia da leishmaniose visceral, foi sugerido que a resistência destes aos parasitos do gênero *Leishmania* spp. está mais relacionado aos aspectos voltados à resistência natural (MANCIANTI, 2004), sendo ligados a genética, do que exclusivamente a imunidade celular (PIRAJÁ et al., 2013).

3.4 Métodos de Diagnóstico

Independente do progresso em recursos de diagnóstico alcançado, o diagnóstico das leishmanioses ainda é motivo de preocupação em vários países endêmicos ao redor do mundo, especialmente em locais mais afastados (HONG et al, 2020). A leishmaniose felina em particular, até o momento, não dispõe de protocolo diagnóstico oficialmente estabelecido, no entanto, emprega-se em gatos, os mesmos testes aplicáveis em cães, envolvendo geralmente a história clínica dos casos, seguida de um ou mais exames laboratoriais (PENNISI, et al 2015; FERNANDEZ-GALLEGO et al, 2020; HONG et al, 2020).

Considerando que as manifestações clínicas nem sempre são características, o diagnóstico biológico é recomendável, podendo basear-se na análise parasitológica e de biologia molecular, no caso de testes diretos, como também na avaliação da resposta imunológica por parte do hospedeiro, no caso de testes indiretos (LÉVÊQUE et al, 2020).

Os testes diretos permitem a visualização do parasito ou de seus componentes, e englobam basicamente a citologia, histologia, imunohistoquímica, cultura e reação em cadeia da polimerase (PCR) (PEREIRA; MAIA, 2021). Abramo et al (2021) demonstraram em sua revisão sistemática que em casos de leishmaniose felina com a presença de lesões cutâneas, tanto ulcerativas como nodulares e linfadenomegalia, a detecção do parasito foi feita,

especialmente, por meio de análises citológicas, seguida de histologia e imuno-histoquímica, podendo ser combinado a estes testes, sempre que aplicável, o uso da PCR para informações adicionais.

Embora a PCR seja um teste extremamente sensível e específico, possibilitando inclusive a caracterização do parasito, é um método impróprio para diagnóstico a campo, necessitando de alto investimento em reagentes e aparelhos, além de equipe especializada (PERINOTO et al., 2010; RAMOS-JESUS et al., 2016). Particularmente, em investigações de *Leishmania* spp. em felinos é possível observar divergência de resultados entre métodos sorológicos e moleculares aplicados em um mesmo estudo, obtendo em alguns casos, maior positividade em gatos com a sorologia do que com a PCR (DEDOLA et al, 2018; AKSULU et al, 2021).

A cultura de parasitos também pode ser aplicada para o isolamento de *Leishmania* spp., possibilitando maior sensibilidade diagnóstica na detecção da infecção ativa, porém, constitui um procedimento demorado, inadequado para diagnóstico de emergência e limitado, geralmente, a laboratórios de referência (LÉVÊQUE et al, 2020; PEREIRA; MAIA, 2021).

Diversas amostras biológicas são encontradas na literatura sendo empregadas em diferentes métodos no diagnóstico direto da leishmaniose em gatos, como sangue total, aspirado de medula óssea, biópsia do baço, biópsia do fígado e de nódulos linfáticos, pele e amostras de mucosa (METZDORF et al, 2017; MOHEBALI et al, 2017; LEAL et al, 2018; HEADLEY et al, 2019; FERNANDEZ-GALLEGO et al, 2020; SILVA et al, 2020). A falta de consenso quanto a amostra biológica ideal para o diagnóstico de leishmaniose felina por métodos parasitológicos ou moleculares, entre outras limitações, torna necessária a combinação de métodos diretos e indiretos para o diagnóstico definitivo (COURA et al, 2018; DEDOLA et al, 2018).

Apesar dos exames parasitológicos serem considerados padrão-ouro por revelar a presença do parasito, requerem mão de obra qualificada, são mais invasivos e em casos de parasitemia baixa podem apresentar resultados negativos (QUEIROZ et al., 2010; RAMOS-JESUS et al., 2016; LÉVÊQUE et al, 2020).

O diagnóstico indireto, realizado por sorologia, representa uma opção analítica consolidada ao longo dos anos, sendo muito empregado por ser de fácil aplicabilidade em material biológico como soro ou plasma (LÉVÊQUE et al, 2020). Os métodos sorológicos utilizados, com maior frequência, na investigação de anticorpos anti- *Leishmania* em gatos envolvem, basicamente, o ensaio imunoenzimático (ELISA) e teste de imunofluorescência (IFAT) (PEREIRA; MAIA, 2021). Neste aspecto, Asfaram, Fakhar e Teshnizi (2019),

evidenciaram em sua revisão sistemática, a utilização da reação de imunofluorescência indireta (RIFI) em mais de 38% dos estudos sobre infecção felina por *Leishmania* spp. em todo o mundo.

Assim a RIFI e o ELISA têm sido largamente aplicados na identificação de gatos acometidos pelo parasito da leishmaniose revelando elevada especificidade, porém, apresentam sensibilidade reduzida e pode acontecer reações cruzadas com outros microrganismos (CALDART et al., 2016). Em exames para triagem e trabalhos epidemiológicos o ELISA não é um recurso prático e econômico, sendo demorado por exigir muitas etapas bioquímicas (RAMOS-JESUS et al., 2016).

Além disso, a diferença de protocolos constitui uma fragilidade importante nos testes sorológicos para diagnóstico de leishmaniose felina, incluindo a falta de um valor de título mínimo estabelecido para IFAT em gatos, sendo adotado pontos de cortes diversos entre os estudos, limitando a comparação de dados (NOÉ et al, 2015; OTRANTO et al, 2017; IATTA et al, 2019).

A aplicação isolada da sorologia no diagnóstico de leishmaniose em gatos pode resultar, portanto, em erros no diagnóstico, já que a sensibilidade e especificidade dos métodos sorológicos podem sofrer influência de diversos fatores, gerando inconsistência entre os resultados dos testes (COURA et al, 2018; FERNANDEZ-GALLEGO et al, 2020).

Estudos têm empenhado esforços na busca de ferramentas analíticas alternativas para elaboração de novos métodos que ofereçam uma análise com alta sensibilidade e especificidade, de baixo custo, com rapidez e praticidade na detecção de agentes patogênicos de interesse à saúde, sendo neste aspecto a tecnologia de sensores biológicos um método promissor (MEDYANTSEVA; KHALDEEVA; BUDNIKOV, 2001; PERINOTO et al., 2010; CABRAL-MIRANDA et al., 2014; RODOVALHO et al., 2015; RAMOS-JESUS et al, 2016; MARTINS et al, 2020).

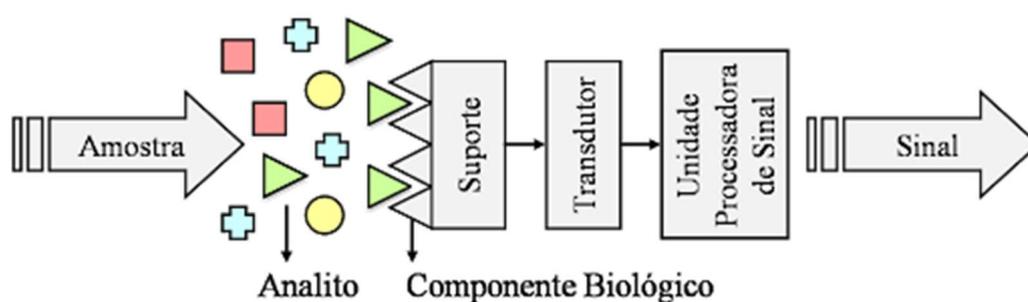
3.5 Biossensores

Os biossensores são dispositivos analíticos compostos por um componente biológico bastante sensível ligado a um equipamento que transforma a interação biológica dos analitos em um sinal elétrico mensurável (SANGEETHA; JULIET, 2014). Geralmente, possuem três constituintes básicos: o componente de reconhecimento biológico, que identifica o estímulo; o transdutor, o qual transforma o estímulo em sinal mensurável e o sistema de processamento de

dados, que amplifica e exibe os dados em um formato apropriado (PERUMAL; HASHIM, 2014).

O componente de reconhecimento biológico ou bioreceptor configura uma camada de material biológico imobilizado, com capacidade de reconhecer e interagir de forma seletiva com o analito de interesse (OLIVEIRA; PEREIRA, 2016; NGUYEN et al, 2019). Em resposta ao evento de biorechecimento, os transdutores, que são dispositivos sensíveis as alterações das propriedades físico-químicas resultantes dessas interações, geram um sinal elétrico mensurável, proporcionalmente equivalente a magnitude ou frequência da concentração do analito alvo (BHALLA et al, 2016; SALOMÃO, 2018). A Figura 1 apresenta as estruturas básicas de um biossensor.

Figura 1- Componentes estruturais de um biossensor.



Fonte: OLIVEIRA; PEREIRA (2016)

Em comparação com outras ferramentas analíticas usuais, os biossensores oferecem alguns benefícios que incluem alta seletividade e sensibilidade, manejo sem técnicos especializados, uso rápido e fácil, portabilidade, reprodutibilidade, baixo custo, detecção em tempo real, uso de pequenos volumes de amostra, resposta rápida e sem pré-tratamento da amostra (PERUMAL; HASHIM, 2014; OLIVEIRA; PEREIRA, 2016; NGUYEN et al, 2019).

A funcionalização de um biossensor acontece na superfície do transdutor por meio da imobilização dos componentes de biorreconhecimento, que conseguem interagir com os analitos sem a necessidade de adição de reagentes na amostra analisada (NGUYEN et al, 2019). De acordo com o material biológico e com a natureza da interação entre o analito alvo e o biorreceptor, os biossensores podem ser classificados em dois grupos: biossensor catalítico, no qual as interações geram um novo produto de reação bioquímica envolvendo células vegetais ou animais, microrganismos, organelas e enzimas; e biossensor de afinidade, no qual as interações promovem a ligação do analito na superfície do transdutor e incluem receptores de ácidos nucleicos e anticorpos (OLIVEIRA; PEREIRA, 2016; NGUYEN et al, 2019).

Com relação a natureza do reconhecimento biológico, os biossensores também podem ser denominados de acordo com sua aplicação, tais como: genossensores (ácidos nucleicos), imunossensores (antígenos ou anticorpos), enzimáticos e microbiológicos (TELES; TAVIRA; FONSECA, 2010; RODOVALHO et al, 2015; ASAL et al, 2018; FAHLIYANI et al, 2020). Outro método de classificação dos biossensores baseia-se no elemento transdutor que pode ser do tipo eletroquímico, óptico, piezoelétricos e calorimétrico, dentre estes os sensores piezoelétricos, constituídos por microbalança de cristal de quartzo (QCM do inglês *Quartz-Crystal Microbalance*), tem demonstrado enorme aplicabilidade na detecção de agentes causadores de doenças em diversos estudos (RAMOS-JESUS et al., 2016; WANG et al., 2017; POHANKA, 2018). O Quadro 2 apresenta a classificação dos biossensores, suas características e aplicações.

Quadro 2 - Classificação dos biossensores com base no biorreceptor e no transdutor.

CLASSIFICAÇÃO DOS BIOSENSORES				
BIORECEPTOR		TRANSDUTOR		
Tipo de interação	Material biológico	Sistemas de Transdução	Modo de medida	Aplicações típicas
Catalítica	Enzimas Organelas Micróbios Células vegetais	Eletroquímicos		
		Condutimétrico	Condutância	Reações catalisadas por enzimas
		Amperométrico	Corrente	Substratos Enzimático
		Potenciométrico	Voltagem	Íons, espécies redox
		Impedimétrico	Impedância	Imunossensores enzimáticos
Afinidade	Ácido Nucleicos Anticorpo Antígeno	Acústicos		
		Piezoelétricos	Massa	Gazes voláteis, vapores, analitos imunológicos
		Ópticos		
		Fibras ópticas	Luminisidade	pH, enzimas
		Colorimétricos		
Termistores, diodos	Calor	Organelas, vitaminas		

Fonte: SALOMÃO (2018) adaptado.

Os avanços na tecnologia de biossensores tem possibilitado inúmeras aplicações em áreas bem diversas, como no âmbito clínico, diagnóstico, processamento de alimentos, controle de qualidade, monitoramento agroindustrial, estudos ambientais, entre outros (FAHLIYANI et al, 2020). No âmbito da saúde e da biomedicina, os biossensores vem adquirindo atenção especial por sua variabilidade de uso em cuidados clínicos, acompanhamento medicamentoso e análise de alimentos, além da detecção de doenças e gestão da saúde do paciente (AYDIN;

AYDIN; SEZGINTÜRK, 2020; MOHANKUMAR et al, 2021). Neste sentido, a técnica QCM vem demonstrando grande potencial para a análise de processos imunológicos, inclusive como ferramenta alternativa para o diagnóstico de doenças infecciosas (POHANKA, 2017; POHANKA, 2018).

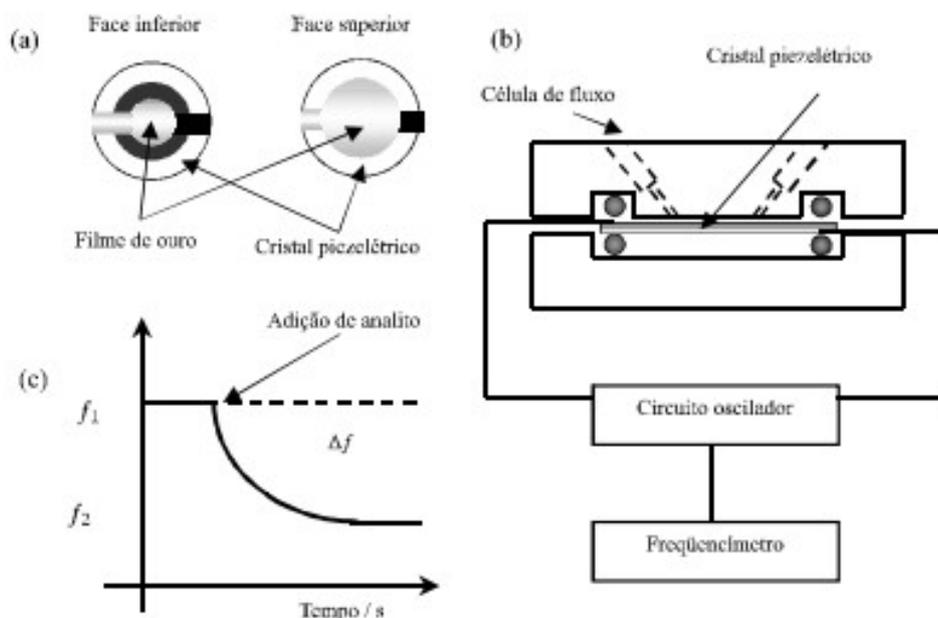
3.5.1 Transdutor Piezoelétrico – Microbalança de Cristal de Quartzo (QCM)

A piezoelectricidade ou efeito piezoelétrico refere-se a uma propriedade física, descoberta por Curie e Curie (1880), que consiste na capacidade de um material produzir sinal elétrico quando submetido a pressão mecânica (CURIE; CURIE, 1880 apud VASHIST; VASHIST, 2011). Essa propriedade é naturalmente encontrada em alguns materiais, sendo o cristal de quartzo um exemplo muito conhecido dentre os materiais piezoelétricos típicos (ZU; WU; WANG, 2016).

Sauerbrey (1959), constatou uma relação diretamente proporcional entre a variação da frequência de oscilação fundamental do cristal de quartzo e a mudança na massa por unidade de área na superfície do cristal, conferindo, sob perspectiva analítica, um recurso satisfatório para elaboração de biossensores que interagem por afinidade (POHANKA, 2017).

O sensor de microbalança de cristal de quartzo (QCM) é constituído por um disco confeccionado em cristal piezoelétrico de quartzo em que as duas faces são revestidas por um constituinte metálico (Figura 2a) que pode ser o ouro, conectadas a um oscilador que é responsável pelo campo elétrico que tem como objetivo provocar uma oscilação no centro do cristal piezoelétrico, em forma de cisalhamento, sendo por isso, também conhecido como transdutor de onda acústica em massa. Ligado ao oscilador, se tem um contador de frequência responsável por monitorar a frequência de ressonância (frequência fundamental) (Figura 2b) que aparece em forma de gráfico no computador (Figura 2c) (DAMOS; MENDES; KUBOTA, 2004; BRAGAZZI et al, 2015).

Figura 2- Esquema ilustrativo de Microbalança de Cristal de Quartzo (QCM). a) Cristal de quartzo; b) Fluxo da ação dos cristais piezoelétricos; c) Gráfico formado pela variação da frequência do cristal de quartzo em função do tempo.



f_1 : frequência inicial do cristal. f_2 : frequência após adição do analito. Δf : variação da frequência. Tempo/s: tempo em segundos.

Fonte: DAMOS; MENDES; KUBOTA (2004)

Assim, o princípio funcional do biossensor piezoelétrico do tipo QCM baseia-se na relação de equivalência entre a mudança na frequência de ressonância do cristal de quartzo e a massa na superfície do cristal, de modo que quanto maior a massa depositada no cristal menor a frequência das oscilações de ressonância (RAMOS-JESUS et al., 2011; WANG et al., 2017; POHANKA, 2018). Sendo capaz de realizar medições em quantidades extremamente baixa na unidade de nanograma com variação da massa de $0,1 - 1 \text{ ng/cm}^2$, por meio de interações por afinidade, sem necessitar da adição de quaisquer reagentes específicos (WANG et al., 2017; POHANKA, 2018).

Quando aplicado em meio líquido, pode sofrer influência quanto a estabilidade da frequência de oscilação, devido a densidade e a viscosidade do líquido (JOHANNSMANN, 2015). Desta forma, as propriedades do meio líquido precisam ser consideradas nas medições do sensor QCM (AFZAL et al, 2017). Neste aspecto, para melhorar a sensibilidade, a aplicação do biossensor QCM pode ser combinada com o monitoramento de dissipação (QCM-D) que permite medir as perdas dissipativas na oscilação do cristal junto com as mudanças na

frequência ressonante, detalhando melhor as alterações estruturais na superfície do sensor (SKLÁDAL, 2016; LIM et al, 2020).

O emprego de biossensores QCM oferecem vantagens em relação aos testes convencionais, com destaque principal para a possibilidade de monitoramento em tempo real das interações biomoleculares de maneira direta, sem necessitar do uso prévio de marcadores químicos e/ou biológicos, reduzindo consequentemente as etapas do ensaio, resultando em um diagnóstico com mais rapidez; outra vantagem é a capacidade de examinar com muita sensibilidade a reação antígeno-anticorpo mesmo em casos assintomáticos em que geralmente a carga parasitária é muito baixa; somado a essas características ainda estão a facilidade de transporte do sensor para execução de testes *in locu* e a possibilidade de ter sua superfície regenerada por desagrupamento do complexo imunológico viabilizando a utilização de um mesmo imunossensor em várias amostras, reduzindo o custo do processo de análise (MEDYANTSEVA; KHALDEEVA; BUDNIKOV, 2001; EP SOUTO et al, 2015; LIM et al, 2020).

3.5.1.1 Imobilização de Biomoléculas

A imobilização das biomoléculas é uma etapa importante para o desempenho eficiente de um biossensor, pois, a forma como os componentes biológicos são fixados e mantidos na superfície do transdutor durante as reações, influencia fortemente na especificidade e sensibilidade do imunossensor (RAMOS-JESUS et al, 2011; PANDEY; MALHOTRA, 2019).

Como no método QCM a detecção acontece baseada na variação da massa, uma resposta de frequência é gerada a partir da interação de qualquer partícula com a superfície do cristal, necessitando ser funcionalizada com receptores capazes de capturar, efetivamente, as moléculas alvo na superfície do cristal, minimizando a adsorção inespecífica (LIM et al, 2020).

Uma variedade de procedimentos para fixação de imunoreceptores tem sido abordado em muitos estudos e, geralmente, a escolha por um destes métodos, ocorre de acordo com o tipo de transdutor e a finalidade de aplicação do dispositivo (RAMOS-JESUS et al, 2011; MAKARAVICIUTE; RAMANAVICIENE, 2013). Entre as técnicas de imobilização são utilizadas mais frequentemente a adsorção física (interações do tipo iônica e polar e ligação de hidrogênio), oclusão ou aprisionamento, ligação covalente e covalente cruzada.

A adsorção é o método mais simples para a imobilização de biomoléculas, pelo qual a superfície do sensor é configurada fisicamente por meio de forças eletrostáticas, tais como interações do tipo van der Waals, interações iônicas, ligações de hidrogênio e interações

hidrofóbicas (PANDEY; MALHOTRA, 2019). Embora este método apresente algumas vantagens, como matriz regenerável, eficácia e menor custo, possui baixa estabilidade pela força de ligação fraca nas interações moleculares e diminuição no desempenho do imunossensor por acontecer arranjos aleatórios de anticorpos nas superfícies (MACKEY; KELLY; NOONEY, 2016; OLIVEIRA; PEREIRA, 2016).

Na oclusão, a imobilização do material biológico acontece através de uma matriz polimérica que forma espaços vazios nos quais o componente biológico se encaixa ficando fixado. Os géis comumente usados para aprisionar biomolécula incluem amido, nylon e poliacrilamida (OLIVEIRA; PEREIRA, 2016; PANDEY; MALHOTRA, 2019). Essa técnica possibilita a difusão livre de compostos biológicos de baixo peso molecular e produtos da reação, formando um sistema simples e econômico de estabilidade relativa (NUNES; MARTY, 2006).

A ligação covalente resulta da ligação entre grupos funcionais do biomaterial e uma matriz de suporte, estando comumente envolvidos nessas ligações os grupos amina (NH₂), carboxila (COOH), hidroxila (OH) e tiol (SH) (PANDEY; MALHOTRA, 2019). A imobilização por meio de ligação covalente é muito utilizada, pois permite a elaboração de imunossensores mais estáveis, necessitando geralmente de alguns passos para sua aplicação: a ativação da superfície do sensor, a ligação do componente de bioreconhecimento e a retirada das moléculas soltas ou suavemente ligadas (GRUHL; RAPP; LANGE, 2011; OLIVEIRA; PEREIRA, 2016).

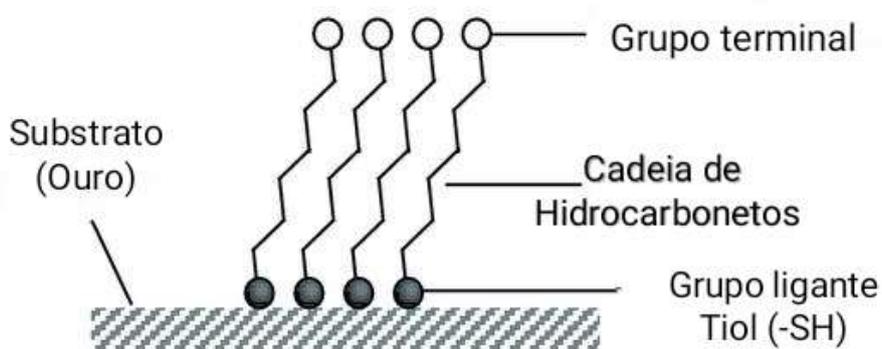
A imobilização através de ligação covalente cruzada possibilita ligações intermoleculares entre os componentes biológicos, formando uma rede tridimensional de biomaterial, pelo uso de reagentes bi ou multifuncionais como o glutaraldeído, melhorando a fixação de biomoléculas, principalmente, em superfície sensora sólida (OLIVEIRA; PEREIRA, 2016; SAWANT, 2017).

Para garantir o bom desempenho de um imunossensor piezoelétrico, o processo de imobilização precisa manter a bioatividade do anticorpo e alcançar uma boa ligação na superfície do sensor evitando por exemplo, a orientação aleatória dos anticorpos (SHARMA et al, 2011; LIM et al, 2020). Assim, diversos estudos usando biossensores baseados em QCM tem buscado melhorar a imobilização de anticorpos através da combinação de métodos ou aplicação de novos ligantes para a fixação de anticorpos (LIM et al, 2020). Neste aspecto, o método de Monocamadas Auto-organizadas do inglês - *Self-Assembled Monolayer* (SAM) tem demonstrado ótimo potencial em biossensores por permitir a modificação da superfície do

eletrodo, formando uma camada ordenada seletiva para biomolécula de interesse, como o anticorpo (ARYA et al, 2009; KLUTSE et al, 2012).

A SAM resulta da quimissorção de moléculas orgânicas em superfícies de metais (KLUTSE et al, 2012). Moléculas contendo enxofre, como dissulfetos de dialcanos (R – SS – R), sulfetos (R – S – R) e alquiltióis formam SAMs altamente ordenados nas superfícies metálicas (SHARMA et al, 2011). Para compreensão estrutural, a SAM de tiol pode ser exemplificada, a qual é composta por um grupo ligante (tiol), que fica acoplado por afinidade ao substrato; uma cadeia de hidrocarboneto e um grupo funcional terminal, que pode variar para adequar a especificidade química da superfície, de acordo com a aplicação pretendida da monocamada (KLUTSE et al, 2012). A Figura 3 apresenta a configuração estrutural de formação da SAM sobre a superfície de ouro, considerando o grupo funcional tiol.

Figura 3- Representação estrutural de Monocamadas Auto-organizadas (SAM) sobre substrato de ouro.



Fonte: KLUTSE et al (2012) adaptado

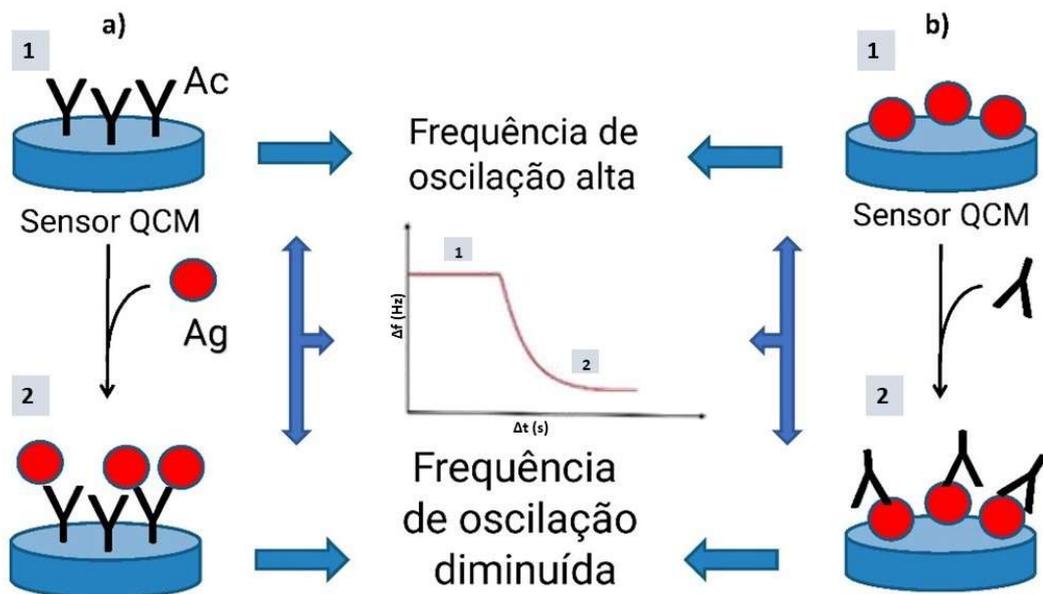
Os SAMs formados por tióis em ouro apresentam ligações fortes e, portanto, mais estáveis, resultando em uma estrutura bem organizada e orientada, sendo muito empregada na elaboração de dispositivos biomoleculares, inclusive em imunossensores piezoelétricos (ARYA et al, 2009; KARCZMARCZYK; HAUPT; FELLER, 2017).

3.5.1.2 Imunossensores Piezoelétrico

Alguns fatores como a sensibilidade elevada, a capacidade de identificar inúmeros tipos de biomoléculas sem marcadores e a rapidez na detecção, tem contribuído para o aumento do interesse na aplicação dos biossensores baseados em QCM para a identificação precoce de infecções e observação do avanço de enfermidades (AFZAL et al, 2017; LIM et al, 2020).

Os imunossensores são biossensores fundamentados em interações entre um anticorpo e antígeno em uma superfície de transdutor, através da imobilização tanto de um anticorpo para reconhecimento de um antígeno quanto pela reação inversa (FELIX; ANGNES, 2018). Os imunossensores piezoelétricos são, portanto, dispositivos analíticos aplicáveis na detecção de diversos componentes macromoleculares e de microrganismos, tendo como constituinte de biorreconhecimento um anticorpo ou um antígeno cuja especificidade interfere na especificidade de todo o imunossensor (POHANKA, 2018). A Figura 4 apresenta o princípio dos imunossensores piezoelétricos.

Figura 4- Princípio de funcionamento dos imunossensores piezoelétricos: (a) para detecção de antígeno; (b) para detecção de anticorpo.



Legenda: Ac- anticorpo; Ag- antígeno; Δt - variação do tempo em segundo; Δf - variação da frequência em hertz
 Fonte: POHANKA (2018) adaptado

A seletividade do alvo está relacionada à capacidade do biossensor de responder seletivamente a um alvo específico (LIM et al, 2020), isso significa que, para manter uma boa especificidade, o imunossensor piezoelétrico precisa conter uma camada biorreceptora específica, de forma a evitar ou diminuir as interações inespecíficas de elementos interferentes presentes na amostra com a área de detecção do sensor piezoelétrico (POHANKA, 2018; LIM et al, 2020).

Os imunossensores piezoelétricos tem sido utilizado em diversos estudos para investigações de interações biomoleculares e imunoenaios, inclusive para detecção de doenças infecciosas (RAMOS-JESUS et al, 2016; POHANKA, 2018). Ramos-Jesus et al (2011), desenvolveram um imunossensor piezoelétrico para detecção de leishmaniose visceral canina

através da imobilização do antígeno de *L. infantum* (rLci2B-NH6) em monocamada auto-organizada (SAM) de cisteamina ativada com glutaraldeído. O imunossensor apresentou boas respostas para o antígeno recombinante *L. infantum* com coeficiente de correlação de 0,981, conseguindo detectar soros positivos e negativos em diluições de até 1:1600.

Na pesquisa realizada por Cabral-Miranda et al. (2014), foi usado também um imunossensor para detectar antígenos de *L. infantum* em tecidos de hospedeiros infectados, com a imobilização de anticorpos em uma superfície de ouro, coberto com cisteamina e glutaraldeído, sendo promissor em detectar amastigotas nos tecidos, ao passo dos autores sugerirem o uso para quantificar amastigotas de *L. infantum* em órgãos de animais experimentais para estudos de patogênese e imunidade. Posteriormente, Ramos-Jesus et al, (2016) propuseram a elaboração de um imunossensor QCM a partir do uso de nanopartícula de ouro (AuNP) e antígeno recombinante rLci2B para identificação de anticorpos de *L. infantum* em soro canino. A AuNP ampliou a superfície de reação com o rLci2B permitindo detectar anticorpos anti- *L. infantum* usando uma concentração muito baixa de antígeno recombinante (3µg/mL).

Diltemiz et al (2013), elaboram um biossensor QCM para o reconhecimento da hemaglutinina (HA), que é uma proteína importante do vírus influenza A, por meio da imobilização de moléculas de ácido siálico (SA) usando um novo ligante de preparação própria dos autores, o ácido 4-aminofenil borônico (4-APBA). O complexo 4-APBA-SA ligado a superfície do cristal rendeu ao sensor QCM capacidade de reconhecimento da glicoproteína HA com limite de detecção de $4,7 \times 10^{-2} \mu\text{M}$, ($0,26 \mu\text{g/ml}^{-1}$).

Zhang et al. (2016), usaram anticorpos anti-HBsAg (anti-HBs) como receptores para detecção de HBsAg, um antígeno de superfície da hepatite B muito aplicado como biomarcador do vírus da Hepatite B. Os anticorpos anti-HBs foram imobilizados direto na superfície do imussensor QCM e um polímero hiper-ramificado (HBP) foi utilizado para amplificar o sinal de resposta do sensor, servindo como ponte para ligação de vários anticorpos secundários formando uma reação do tipo sanduíche simples. Por esse método, obteve-se uma mudança cinco vezes maior na frequência, possibilitando o registro quantitativo de HBsAg com um limite de detecção muito pequeno de $2,0 \text{ ng/mL}^{-1}$, um dos menores encontrados na literatura pela técnica QCM.

Estudos envolvendo a técnica QCM como ferramenta analítica também já foram realizados para o diagnóstico da dengue, como o trabalho de Pirich et al (2017), que elaboraram sensores piezoelétricos a partir do revestimento prévio com filmes finos de nanocristais de celulose bacteriana (CN) preparando uma interface mais sensível para fixação

da imunoglobulina G monoclonal (IgGNS1) para reconhecimento específico da proteína não estrutural 1 (NS1) da dengue. A detecção da NS1 foi realizada pelo imunossensor com (QCM-D) e sem monitoramento de dissipação de energia (QCM), obtendo os limites de detecção de $0,1 \mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ para QCM-D e $0,32 \mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ para QCM, apresentando, estes dispositivos, bom potencial para ensaios diagnósticos mais sensíveis, rápidos e de menor custo para dengue.

Sharma et al (2011), desenvolveram um imunossensor piezoelétrico para detecção direta do antígeno da proteína-2 rica em histidina (PfHRP-2), que é um importante biomarcador do *Plasmodium falciparum*, o agente causador da malária. Os anticorpos anti-PfHRP-2 foram imobilizados na superfície do cristal de quartzo funcionalizada por monocamadas auto-organizadas (SAM) de ácido tiótico e 1-dodecanotiol demonstrando viabilidade na identificação do antígeno PfHRP-2 com limite de detecção 12 ng/ml.

Os imunossensores piezoelétricos baseados em QCM tem demonstrado, portanto, excelente capacidade de detectar biomarcadores de doenças com baixos limites de detecção, sendo uma promissora ferramentas para diagnósticas precoce de doenças infecciosas (LIM et al, 2020). Assim, neste trabalho foi desenvolvido o primeiro protótipo de imunossensor baseado em QCM para detecção qualitativa de anticorpos anti- Antígeno A2 para identificação de infecção por *Leishmania* spp. em gato.

A proteína recombinante A2 vem desempenhando excelente papel como biomarcador para o sorodiagnóstico de Leishmaniose visceral (GHEDIN et al, 1997; CARVALHO et al, 2002; JUSI et al, 2015). Os antígenos A2 foram descritos como uma família de proteínas expressas no estágio amastigota de *L. donovani* com número variável de repetições de uma unidade de 10 aminoácidos (CHAREST; MATLASHEWSKI, 1994; ZHANG et al, 1996). No âmbito analítico, essa característica amplia o alvo de reação do anticorpo, tornando o antígeno A2 reconhecido, em vários estudos, como valioso recurso para aplicação no imunodiagnóstico específico da leishmaniose visceral (GHEDIN et al, 1997; CARVALHO et al, 2002). A expressão do antígeno A2 também já foi confirmada em amastigotas das espécies: *L. infantum* e *L. amazonensis* (GHEDIN et al, 1997; CARVALHO et al, 2002; JUSI et al, 2015).

4 MATERIAS E MÉTODOS

4.1 Declaração de ética

A metodologia do presente estudo foi aprovada para execução pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Tocantins (UFT), por meio do projeto intitulado “Desenvolvimento de Imunossensor Piezoelétrico para Identificação de Leishmaniose em Felinos”, sob o Processo nº 23.110.002.458/2020-12, estando de acordo com a Lei Nº 11.794 de 8 de outubro de 2008, que trata dos procedimentos éticos para o uso científico de animais (Anexo I).

4.2 Proteína Recombinante A2 (rA2) e Soro felino

O antígeno usado foi a proteína recombinante A2 de *Leishmania* spp., adquirido em solução salina tamponada na concentração de 0,10 mg/ml da empresa Petmarket solutions.

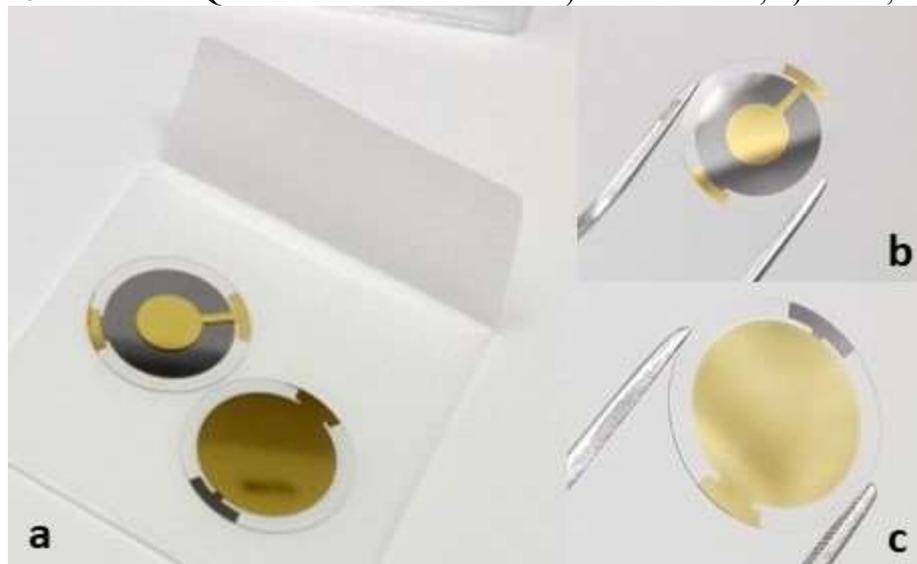
A amostra de soro felino sabidamente positiva para *L. infantum* foi proveniente de um animal diagnosticado com leishmaniose por exame parasitológico direto de aspirado de células dos linfonodos submandibular, poplíteo e subescapular; por sorologia pelo método de aglutinação direta (DAT), apresentando titulação de 1:640 e por PCR de aspirado de célula de linfonodo sendo positivo para *L. infantum*. Para obtenção do soro do animal utilizado no teste, foi obtida uma amostra de sangue, por punção da veia jugular, depositada em tubo com ativador de coágulo, centrifugado e a fração sérica retirada e armazenada em microtubos a -20°C. A amostra de soro do animal apresentou resultado positivo também ao teste imunocromatográfico, que utiliza o antígeno recombinante específico (rK39), padronizado para detecção de anticorpos em humanos (Teste rápidoimunocromatográfico LSH Ab ECO teste).

4.3 Descrição da Microbalança de Cristal de Quartzo (QCM)

Para realização dos testes foram utilizados sensores de cristais de quartzo piezoelétrico com corte AT (Novaetech), com frequência de oscilação em forma de cisalhamento de 10 MHz, colocados entre dois eletrodos de ouro para conexão elétrica (

Figura 5). O revestimento do eletrodo é constituído por ouro com adesão aprimorada pelo uso de substrato de Titânio (Ti), apresentando espessura de ~ 200 nm de Au (em substrato de Ti ~ 10 nm).

Figura 5 - Cristal de Quartzo revestido de ouro. a) frente e verso; b) frente; c) verso



Fonte: NOVAETECH (2021)

A Sensibilidade nominal do sensor foi de $4,42 \times 10^{-9} \text{ g Hz}^{-1} \text{ cm}^{-2}$, a relação entre frequência e a estabilidade térmica foi de $\pm 20 \text{ KHz}$ a $23 \text{ }^\circ\text{C}$ com densidade de $0,0026497 \text{ Kg / m}^3$ a 25°C . A espessura de quartzo usada foi de $\sim 160 \text{ }\mu\text{m}$ com diâmetro total de $13,9 \text{ mm}$. O eletrodo tinha diâmetro de 6mm revestido com Ouro (Au), sendo a conexão elétrica realizada por meio de eletrodos móveis da câmara de reação de QCM proposta, onde o cristal usa conexões tipo HC-48/U. A superfície do cristal de quartzo era do tipo plana e polida com necessidade de preparação prévia para o uso.

O dispositivo usado para realização das análises foi uma QCM com monitoramento de dissipação (QCM-D) (Novaetech), composta por uma câmara de reação aberta (Figura 6a) ligada por uma entrada UBS na QCM-D (Figura 6b), sendo conectada por uma micro UBS a um computador para acompanhamento e registro das leituras usando o software OpenQCM-Q1 (Figura 6c). Os dados, após análise, foram tratados usando o software Excel, para apresentação gráfica dos resultados.

Figura 6- Sequência de montagem da microbalança de cristal de quartzo (QCM). a) Câmara de reação com o cristal de quartzo acoplado; b) QCM-D; c) Computador operando com o software OpenQCM-Q1.

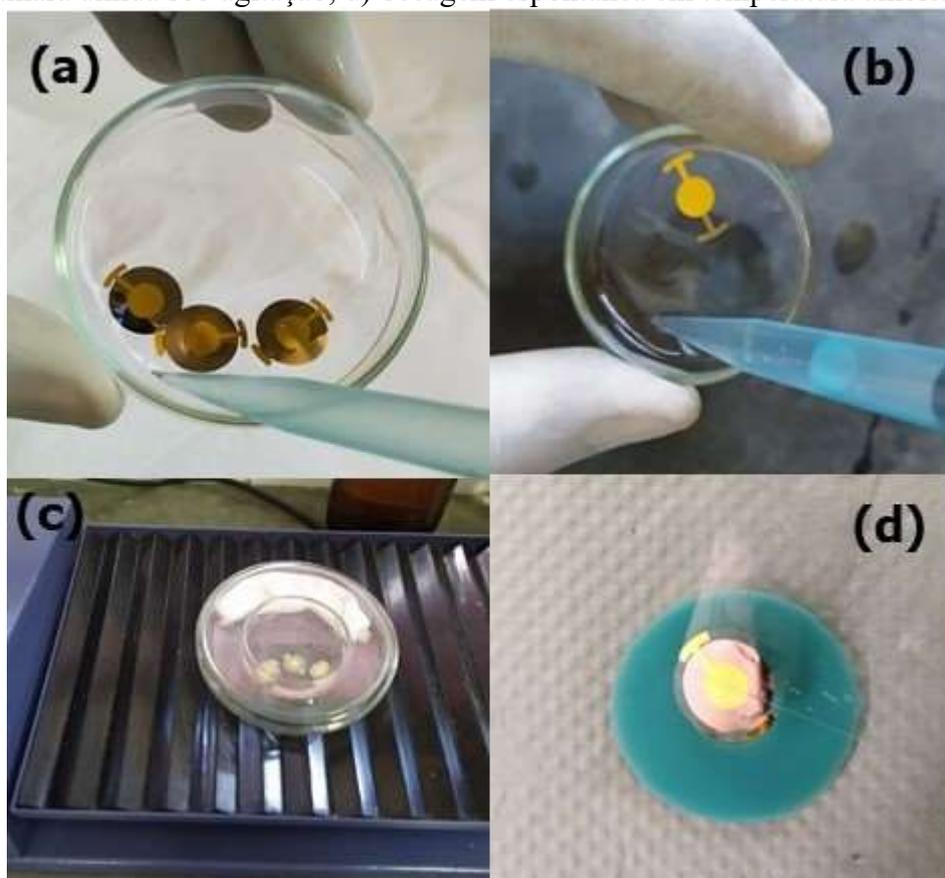


Fonte: Próprio autor

4.4 Preparo da superfície do sensor

Para o preparo da superfície de biorreconhecimento, o eletrodo de ouro do sensor QCM foi limpo, por meio de imersão, em uma solução “piranha” preparada na proporção 1:3 partes de H_2O_2 30% (peróxido de hidrogênio) v/v em H_2SO_4 (ácido sulfúrico) concentrado por 2 minutos (Figura 7a), em seguida foi lavada, por imersão rápida, com água ultrapura (Figura 7b). Em seguida, os sensores QCM foram submersos em álcool metílico em câmara úmida sob agitação constante por 30 minutos (Figura 7c) para remoção completa de qualquer resíduo da solução de limpeza, seguida de uma lavagem abundante com água ultrapura e secagem espontânea em temperatura ambiente (Figura 7d).

Figura 7- Preparação do sensor de cristal de quartzo (QCM). a) Lavagem com solução “piranha”; b) Lavagem com água ultrapura; c) Imersão dos sensores em álcool metílico em câmara úmida sob agitação; d) Secagem espontânea em temperatura ambiente.



Fonte: Próprio autor

4.5 Elaboração do imunossensor por adsorção simples tipo Ouro-antígeno recombinante A2 (Au-rA2)

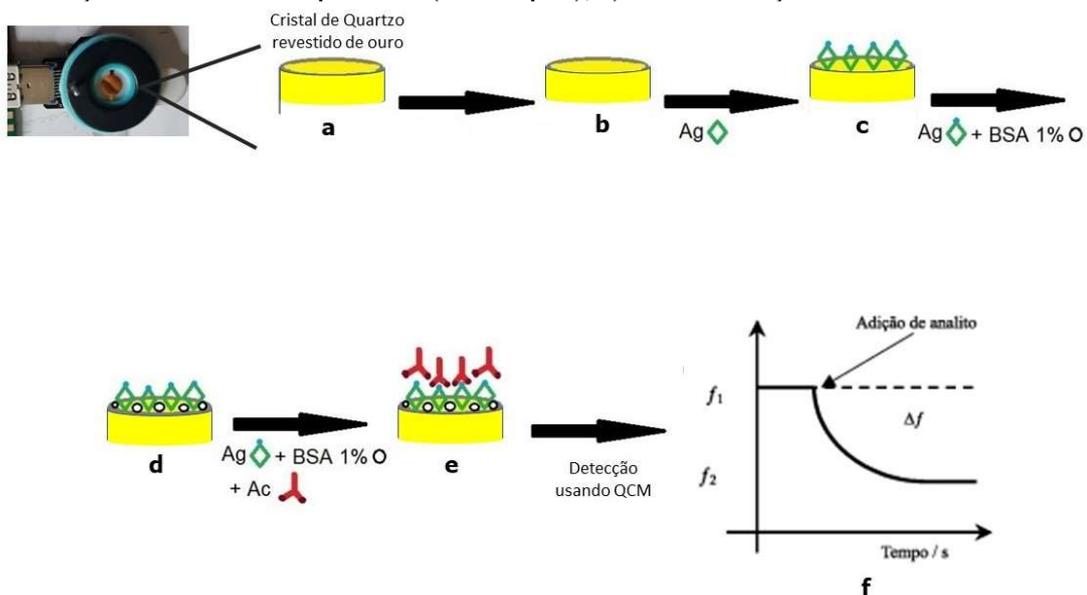
A microbalança de cristal de quartzo com monitoramento de dissipação (QCM-D) foi usada como um dispositivo para monitorar a ligação de anticorpo anti-antígeno A2 / ou os agentes interferentes a uma superfície de cristal revestida de ouro coberta com antígeno recombinante A2.

Depois de preparado, conforme descrito anteriormente, o sensor QCM foi acoplado a câmara de reação aberta, conectada ao software de análise OpenQCM-Q1 para registro dos dados de frequência. O processo de leitura foi iniciado pela adição de 100 μ l de água ultrapura sobre o eletrodo de ouro do sensor e deixado por 10 minutos para estabilização do sinal de leitura. Devido ser do tipo câmara aberta as adições e retiradas de reagentes foram realizadas pela parte superior da câmara de forma simultânea.

Para o preparo da superfície de biorreconhecimento, uma solução salina tamponada de proteína recombinante A2 a 0,1mg/ml foi adicionada (100 μ l) no eletrodo de quartzo e deixado interagir por 2 horas e 40 minutos, sendo registrado os dados de frequência. Neste momento, ocorreu a ligação por adsorção espontânea do antígeno rA2 na interface de ouro do cristal. Em seguida, o sensor de quartzo, agora funcionalizado com a molécula de biorreconhecimento, foi lavado com 100 μ l de água ultrapura em triplicata para remover os antígenos rA2 não adsorvidos na superfície do imunossensor. Para bloqueio de ligações inespecíficas, 100 μ l de uma solução de albumina de soro bovino (BSA) a 1% (m/v) em PBS foi pipetada na câmara de reação, e as leituras de frequência foram realizadas por 60 minutos. Posteriormente, o sensor QCM foi lavado por três vezes com 100 μ l de água ultrapura.

Em seguida, a resposta analítica foi avaliada a partir da adição de soro felino (100 μ l) no eletrodo de ouro sensibilizado e as leituras de frequência foram realizadas por 45 minutos. Por fim, água ultrapura (100 μ l) foi adicionada na câmara de reação para lavagem, por injeção e aspiração, repetindo-se o procedimento por três vezes, sendo feitas as leituras de frequência por 15 minutos. As etapas descritas na elaboração do imunossensor por adsorção simples tipo Au-rA2 estão ilustradas na Figura 8.

Figura 8 - Representação esquemática da elaboração do imunossensor piezoelétrico por adsorção do antígeno na superfície do cristal de quartzo revestido de ouro. a e b) Etapas de preparação do sensor; c) Imobilização do antígeno (proteína recombinante A2 de *Leishmania infantum* a 0,1mg/ml); d) Bloqueio com solução de albumina de soro bovino (BSA); e) Adição de soro felino positivo (anticorpos); f) Demonstração de leitura do teste.



Legenda: Ag: antígeno; Ac: anticorpo; BSA - Albumina Bovina Sérica
 Fonte: MARTINS et al. (2020) adaptado

4.6 Elaboração do imunossensor por Monocamadas Auto-organizadas (SAM) tipo Ouro-dissulfeto de carbono-antígeno recombinante A2 (Au-CS₂-rA2)

Após a preparação, o sensor QCM foi submerso em solução aquosa de dissulfeto de carbono (CS₂) a 0,1M (1:1, v/v) e colocado em câmara úmida sob agitação constante por 2 horas e 30 minutos, para iniciar o preparo da superfície de bioreconhecimento, através da ligação direta do terminal -S₂ (enxofre) do CS₂ na superfície revestida de ouro do sensor. Em seguida, o sensor foi cuidadosamente lavado com água ultrapura por 5 minutos para remover as moléculas de CS₂ não adsorvidas na superfície do imunossensor.

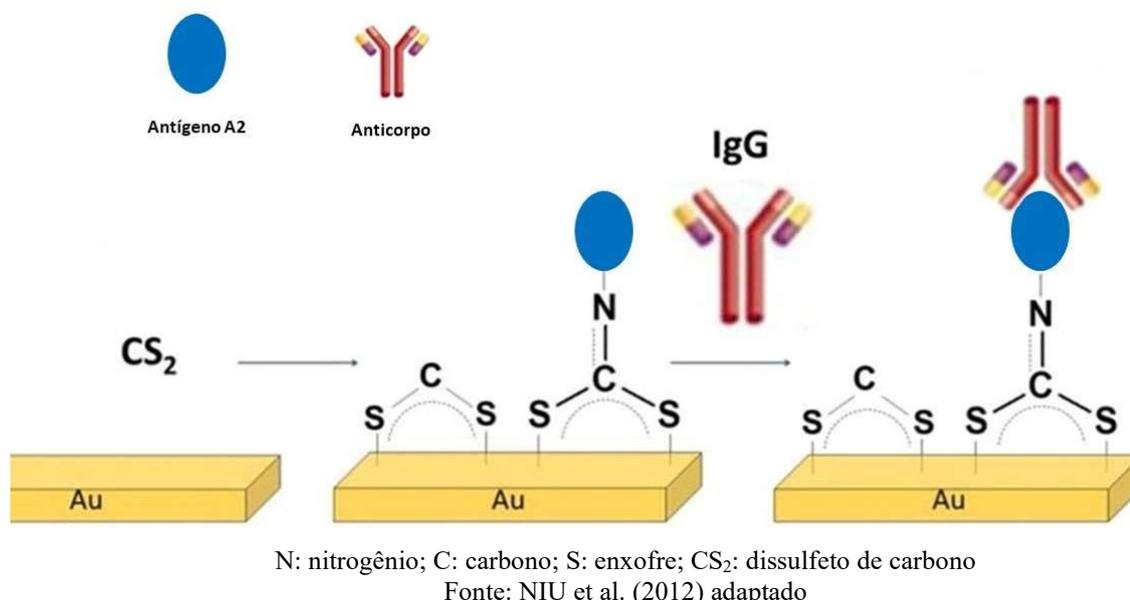
Depois de pré-funcionalizado, o sensor foi acoplado a câmara de reação aberta, da microbalança de cristal de quartzo, com monitoramento de dissipação (QCM-D) realizada por software de análise para registro dos dados de frequência e dissipação nas demais etapas da reação.

O processo de leitura foi iniciado pela adição de 100µl de água ultrapura sobre o eletrodo de ouro do sensor e deixado por 10 minutos para estabilização do sinal de leitura. A segunda camada da SAM foi formada adicionando sobre o sensor, 100µl da solução salina tamponada de proteína recombinante A2 a 0,1mg/ml, sendo feitas as leituras de frequência e dissipação por 50 minutos. Neste momento, a ligação covalente pelo grupo reativo da amina do antígeno rA2 com os terminais de carbono do CS₂ era efetivada. Em seguida, o sensor de quartzo, agora funcionalizado com a molécula de bioreconhecimento, foi lavado com água ultrapura. Para o bloqueio de ligações inespecíficas, uma solução de BSA a 1% (m/v) em PBS foi pipetada na câmara de reação, e as leituras de frequência e dissipação foram feitas durante 30 minutos. Após o sensor QCM foi lavado com 100 µl de água ultrapura.

Por fim, a resposta analítica foi avaliada a partir da adição de soro felino (100µl) no eletrodo de ouro e as leituras de frequência e dissipação foram feitas por 30 minutos. Em seguida, água ultrapura (100 µl) foi adicionada na câmara de reação para lavagem por três vezes por injeção e aspiração, sendo realizadas as leituras de frequência e dissipação.

A Figura 9 apresenta a elaboração do imunossensor por Monocamadas Auto-organizadas (SAM) tipo Au-CS₂-rA2.

Figura 9- Diagrama esquemático da elaboração do imunossensor por Monocamadas Auto-organizadas (SAM) tipo Au-CS₂-rA2. a) Imersão do sensor em solução aquosa de dissulfeto de carbono (CS₂) a 0,1M; b) Adição do antígeno A2 de *Leishmania infantum* com a efetivação da ligação covalente pelo grupo reativo da amina do antígeno rA2 com os terminais de carbono do CS₂; c) Adição de soro felino positivo (anticorpos) se ligando ao antígeno.



4.7 Avaliação da reatividade do sensor

As medidas nanogravimétricas foram realizadas por meio do software OpenQCM-Q1 gerando um gráfico em tempo real e registrando um banco de leituras que ficaram armazenadas no computador. Após as análises, a lista de leituras foi processada utilizando o software Excel para apresentação gráfica dos resultados.

A resposta do sistema sensor foi avaliada por meio da variação de frequência em função do tempo antes e após a adição da amostra. Avaliou-se também a resposta do sistema após a lavagem do mesmo com solução tampão, com o objetivo de comprovar a regeneração do eletrodo. Para a reação entre o antígeno e anticorpo, foi avaliada a da frequência de oscilação do cristal de quartzo na presença do analito de interesse.

A especificidade do imunossensor foi testada incubando a amostra de soro felino positiva, não diluída. As amostras foram consideradas positivas pelo decréscimo na variação de frequência do imunossensor.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Análise da preparação do imunossensor

Na preparação do imunossensor foi utilizado como bloqueador a BSA a 1% em PSB para melhorar a sensibilidade dos sensores desenvolvidos neste estudo, por efetuar o bloqueio de espaços que não foram cobertos pelo antígeno na superfície do sensor e, assim, evitar eventuais interações não específicas.

Na elaboração de imunossensores é primordial a preparação de uma interface sensível aos analitos de interesse (RAMOS-JESUS et al, 2016), por isso a necessidade de evitar a ligação de interferentes inespecíficos presentes no material biológico com a superfície sensora, sendo comumente utilizados agentes bloqueadores, como a solução de albumina de soro bovino (BSA) para preencher locais expostos do eletrodo, impedindo a geração de sinal falso positivo do imunossensor por ligação de biomoléculas não alvo (RAMOS-JESUS et al, 2016; PIRICH et al., 2017; CORDEIRO et al, 2020).

Outras substâncias, além da Albumina -BSA, possuem capacidade de bloqueio, como por exemplo as substâncias caseína, glicina, gelatina (MOORE, et al. 2004; PARK, et al 2003), todavia, a escolha da albumina deu-se pelo seu baixo custo, facilidade para aquisição e, principalmente, como afirmam Chapman et al. (2000), pelo seu uso padrão como substância bloqueadora.

Somado a isto, tem-se que soros de felinos acometidos por infecções podem apresentar alterações nas concentrações séricas de proteínas de fase aguda, podendo resultar em adsorção inespecífica (SANTOS; ALBERTO, 2014) e o uso da BSA no presente estudo, foi realizado para melhorar a sensibilidade dos sensores por efetuar o preenchimento de espaços que não foram cobertos pelo antígeno na superfície do sensor.

Priorizando a especificidade dos testes, foi empregado antígenos recombinantes ao invés de antígenos naturais, para diminuir a possibilidade de reações inespecíficas e obter melhor desempenho dos imunossensores. Recurso adotado também por Ramos-Jesus et al (2016) e Cordeiro et al (2020) em estudos anteriores. Maia e Campino (2008), demonstraram em seu estudo sobre os métodos para diagnóstico da leishmaniose canina e resposta imune à infecção, que a especificidade dos antígenos naturais é inferior ao dos antígenos recombinantes, pois podem favorecer a ocorrência de reações cruzadas com outras moléstias, principalmente em áreas endêmicas.

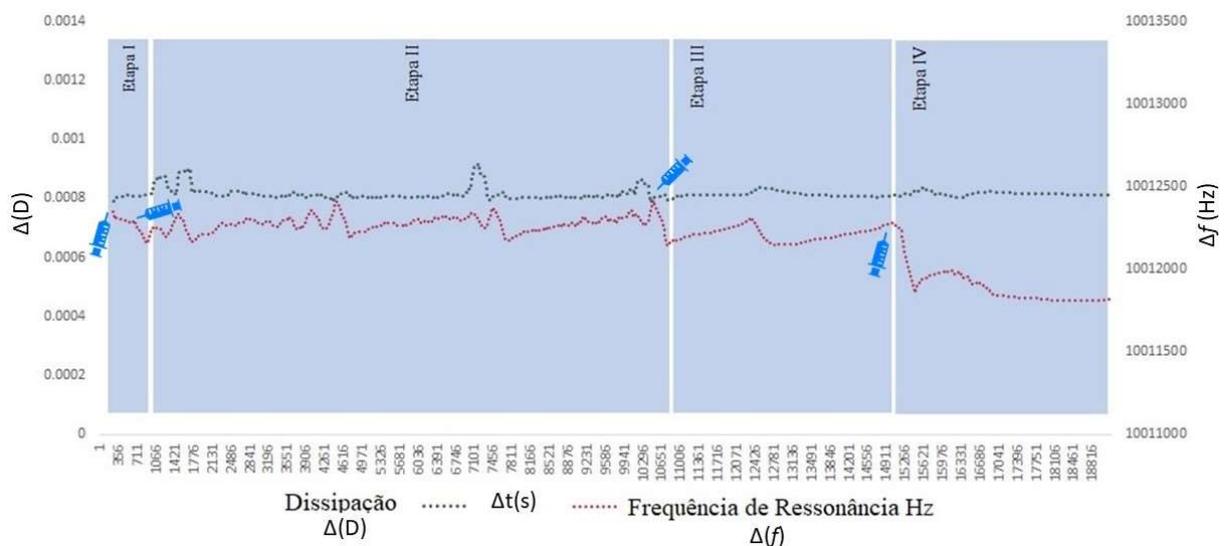
Porrozzì et al. (2007) mostraram que os testes sorológicos usando a proteína recombinante rK39 e rK26 (ambos de *L. infantum*) foram mais eficientes para identificar cães sintomáticos enquanto os antígenos recombinantes rA2 (de *Leishmania donovani*) parecem ser eficazes para o sorodiagnóstico de cães assintomáticos com a doença (88%) do que rK39 e rK26 (ambos 66%) e antígenos naturais (30%). Curiosamente, os felinos com leishmaniose visceral, em sua maioria, também costumam ser assintomáticos (COURA et al, 2018), o que corroborou a decisão do uso do antígeno recombinante A2 no presente estudo.

É importante destacar que, após análise da literatura, este é o primeiro estudo envolvendo a detecção de anticorpos contra *L. infantum* em soro felino utilizando como plataforma de investigação um imunossensor piezoelétrico.

5.2 Análise da capacidade de reconhecimento do imunossensor por adsorção simples tipo Ouro-antígeno recombinante A2 (Au-rA2)

As etapas da reação desde a funcionalização (etapa I-III) até a medição (etapa IV), estão demonstradas na figura 10.

Figura 10- Resposta analítica do imunossensor tipo Au-A2 por adsorção simples monitorada em tempo real por QCM-D



Legenda: $\Delta(D)$ -variação da dissipação; $\Delta f(\text{Hz})$ - variação da frequência em hertz; Δt (s)- variação do tempo em segundos

Fonte: Próprio autor

A linha de base inicial (etapa I fig. 9) corresponde à fase com apenas adição de água ultrapura sobre o sensor para estabilização do sinal de leitura (10012295 Hz de frequência de

ressonância), antes da adição da solução de antígeno A2 a 0,1mg/ml em solução salina tamponada. Uma diminuição imediata na frequência (f), juntamente com um aumento na dissipação (D), foi observada quando a solução de antígeno foi adicionada, evidenciando a diferença de densidade da solução em relação a água (etapa II fig. 9). Esse leve decaimento da frequência de ressonância (f) de 35Hz ao longo do tempo, pode ser atribuído ao acúmulo de partículas fracamente ligadas na interface do cristal.

A fase II corresponde a ligação espontânea do antígeno A2 sobre a superfície de ouro do sensor, por adsorção física gradual, durante 2 horas e 40 minutos em temperatura ambiente (21°C) sendo, portanto, a etapa mais demorada no processo de elaboração do imunossensor. O tempo de reação usado para imobilização do antígeno neste experimento está compreendido entre as medições estabelecidas por Bohli et al. (2019) para otimização das medidas de impedância da camada de antígeno, adicionada em relação ao tempo de incubação, variando de 2 horas a cerca de 18 horas.

Após a adição da BSA 1% (etapa III na Fig. 9) foi observado um deslocamento negativo na frequência, sugerindo a adesão da proteína na superfície do cristal, conforme evidenciado por Poitras; Fatisson; Tufenkji (2009). Ocorreu uma leve variação na dissipação, sugerindo maior rigidez na camada de proteína adsorvida. Esse padrão também foi observado por Jachimska et al. (2018), em suas medições de adsorção da proteína β -lactoglobulina (LGB). Esta variação também foi observada no modelo descrito por Sauerbrey (1959), no qual as “camadas rígidas” são caracterizadas por baixa dissipação.

A lavagem do sensor com água ultrapura para eliminação de albumina não adsorvida, realizada no final da etapa III, resultou em um pequeno aumento da frequência, devido a redução da massa sobre o cristal após a lavagem. A diferença na média de variação da frequência de ressonância observada entre a etapa II e III da reação, indica a efetividade no processo de funcionalização do sensor.

No momento da adição da amostra de soro felino (etapa IV F) foi observada queda acentuada na frequência, que pode ser atribuída a maior viscosidade da amostra. O desempenho analítico do imunossensor foi estabelecido de acordo com a cinética de adsorção resultante da interatividade específica do antígeno A2 fixado no sensor, com o anticorpo anti-antígeno A2 presente no soro teste, formando imunocomplexo, elevando, conseqüentemente, a massa adsorvida sobre a superfície do sensor, o que resulta na diminuição acentuada da frequência. De acordo com Sauerbrey (1959), um aumento na massa aderida na superfície do cristal é refletido por uma diminuição na frequência de ressonância do cristal.

No final da etapa IV, observou-se falta de mudanças na frequência, sugerindo a estabilidade das ligações antígeno-anticorpo, forte o suficiente para não ser desfeita com o protocolo de lavagem realizado com água ultrapura. No experimento de Ventura et al. (2017), este comportamento também foi observado, sendo a falta de variação na frequência atribuída a ligações específicas ocorridas na fase de biorreconhecimento. A alta afinidade e especificidade do anticorpo em relação ao seu antígeno configura o princípio fundamental de um imunossensor (BOHLI et al., 2019).

O padrão de resposta apresentado pelo imunossensor por adsorção simples é indicativo de detecção de anticorpos anti-antígeno A2 presente no soro felino, ao considerar a diminuição progressiva das médias de variação da frequência a cada etapa da reação, permanecendo baixa ao final da análise. No entanto, testes adicionais precisam ser realizados para avaliar melhor a resposta analítica do imunossensor, avaliando a seletividade do sensor por meio de testes de amostras positivas e negativas, conforme realizado por Ramos-Jesus et al. (2016); estabelecer um limite mínimo detectável de anticorpos na amostra, aplicando diluições seriadas para reduzir as possibilidades de interações inespecíficas com outras proteínas da amostra, permitindo avaliar a especificidade do teste e indicar as titulações identificadas pelo biossensor (RAMOS-JESUS et al, 2016; PIRICH et al, 2017).

Um fator importante para o desenvolvimento de biossensores está voltado para ligação das moléculas de bioreconhecimento à superfície de um substrato (BHAKTA et al, 2015). A adsorção direta configura-se como a técnica mais simples para imobilização de proteínas em superfícies sólidas, que ocorre, espontaneamente e por afinidade, através de interações hidrofílica, hidrofóbicas e eletrostáticas ou pela associação dessas interações (JUNG; JEONG; CHUNG, 2008; BOHLI et al, 2019). Os anticorpos adsorvidos, por este método, no entanto, são orientados aleatoriamente, podendo comprometer sua capacidade de ligação ao antígeno por desnaturação (JUNG; JEONG; CHUNG, 2008).

Neste estudo, porém, adotou-se o modelo de reconhecimento indireto para elaboração do imunossensor proposto, a partir da imobilização do antígeno na superfície de ouro do sensor QCM-D para detecção de anticorpos presente na amostra analisada. A escolha pelo reconhecimento indireto concorda com o modelo adotado por Bohli et al. (2019), ao demonstrarem que o uso de antígeno como bioreceptor na elaboração de imunossensores impedimétricos por adsorção física, com o uso de nanopartículas de ouro, apresentou resposta mais sensível quando comparado ao modelo clássico de imunossensor, desenvolvido nas mesmas condições. Conforme aplicada em diversos estudos a QCM-D é uma técnica bem adequada para monitorar a cinética de adsorção de proteínas em uma superfície

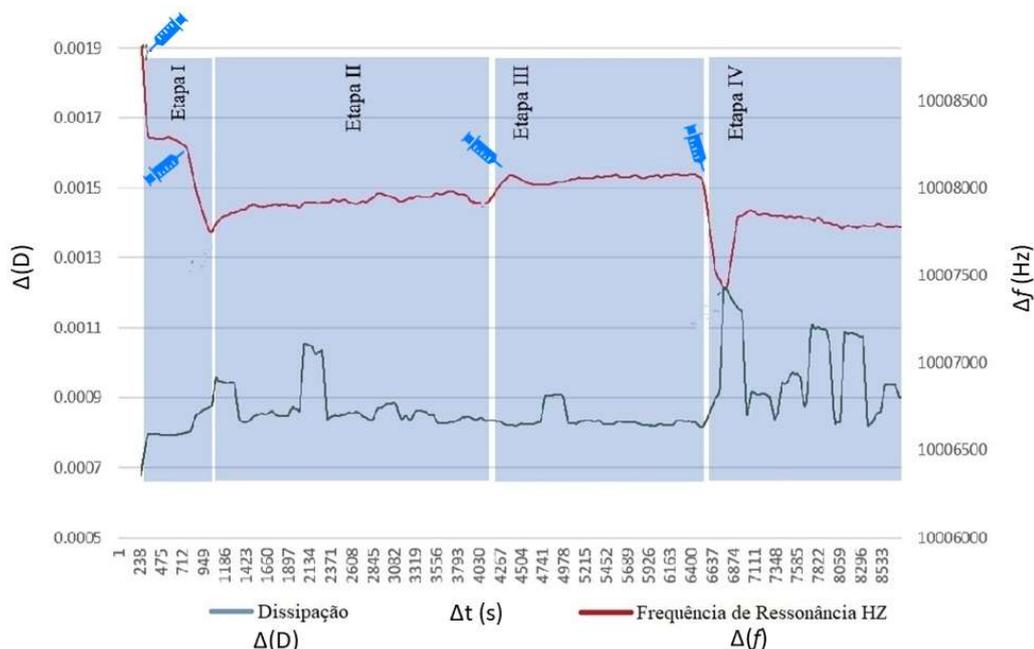
(DOLATSHAHI-PIROUZ et al, 2008; POITRAS; FATISSON; TUFENKJI, 2009; JACHIMSKA et al, 2018).

5.3 Análise da capacidade de reconhecimento do imunossensor por Monocamadas Auto-organizadas (SAM) tipo Ouro-dissulfeto de carbono-antígeno recombinante A2 (Au-CS₂-rA2)

A solução aquosa de CS₂ utilizada para formação da monocamada auto-organizada (SAM) resultou em registro de frequência (10010572 Hz) abaixo da linha base de leitura do dispositivo QCM-D, sugerindo que ocorreu adsorção de moléculas de CS₂ na camada de ouro (Figura 11 etapa I).

Uma queda entre as médias de variação da frequência de ressonância foi observada entre a etapa I (10008258 Hz) e a etapa II (10007965 Hz), devido a adição do antígeno rA2 sobre o sensor, sugerindo a ocorrência de ligação covalente através da fração amina presente no antígeno e o terminal carbono do CS₂ adsorvido no eletrodo, possibilitando forte fixação do antígeno na interface do cristal (etapa II figura 11). No final da fase de imobilização, mesmo após a retirada de moléculas não ligadas através da lavagem do sensor, a frequência de oscilação do cristal permaneceu mais baixa, com diferença de 293 Hz.

Figura 11- Resposta analítica do imunossensor tipo Au-CS₂-A2 monitorada em tempo real por QCM-D



Legenda: $\Delta(D)$ -variação da dissipação; $\Delta f(\text{Hz})$ - variação da frequência em hertz; Δt (s)- variação do tempo em segundos

Fonte: Próprio Autor

Na etapa de bloqueio (etapa III, figura 10), um comportamento diferente foi observado na variação da frequência: exibindo inicialmente uma pequena redução induzida, provavelmente, pela adição da solução bloqueadora (BSA 1%), e no final apresentou um aumento de 117 Hz ao comparar com a média da variação da frequência atingida na etapa II. Isso pode ser indicativo de uma conformação estrutural na camada formada sobre o sensor não havendo espaços para o bloqueio.

Mudanças na frequência de ressonância (f) e fator de dissipação (D) foram monitorados durante a adição de soro de gato infectado (100 μl), na etapa de biorreconhecimento (etapa IV figura 11), traçando o perfil de resposta do imunossensor na detecção de seu analito alvo. Os desvios medidos na média de variação da frequência de ressonância (10007825 Hz), apresentou queda de 257Hz, podendo ser atribuídos à ligação específica dos anticorpos à camada de antígenos imobilizados por CS₂ no eletrodo de ouro. Já a variação na medida da dissipação pode estar relacionada a mudança da viscosidade do meio pela adição da amostra.

A funcionalização do sensor foi feita com base no acoplamento covalente do antígeno recombinante A2 implementada pela prévia quimissorção direta do terminal -S (enxofre) do dissulfeto de carbono (CS₂) sobre o sensor revestido de ouro e, posterior interação de seu terminal -C (carbono) com aminas presentes na estrutura proteica do antígeno A2. Segundo Niu

et al. (2012) este método mostra um potencial promissor para a imobilização do ligante em imunossensores que utilizam a superfície de ouro como substrato. O dissulfeto de carbono apresenta em sua estrutura dois grupos funcionais terminais (-C-S₂) e a alta afinidade do terminal enxofre com o ouro possibilita a ligação forte e organizada das moléculas de CS₂ sobre a superfície do sensor, deixando livre o terminal carbono para interação com o biocomponente, podendo reagir espontaneamente com grupos amina (SÁNCHEZ et al., 2016).

O método de imobilização por formação de SAM de CS₂ pode simplificar o procedimento de modificação de superfície de ouro, por possibilitar a ligação covalente de ouro-tiol espontânea em uma única etapa, reduzindo o tempo necessário para a imobilização do biomaterial, sendo uma alternativa aos SAMs de alcanotiol, que precisam de etapas adicionais de funcionalização para ativar os terminais de SAM, para ligação covalente de biomoléculas (NIU et al, 2012; SÁNCHEZ et al, 2016; PAIVA et al, 2017). Neste estudo, as etapas de preparação foram reduzidas em duas (adsorção de SAM de CS₂ e posterior reação com o biocomposto).

Niu et al, (2012) na elaboração de uma interface imunossensora, monitorada por ressonância plasmônica de superfície (SPR) demonstraram a capacidade de prevenir a adsorção inespecífica de proteínas às superfícies de biorreconhecimento pela funcionalização implementada por CS₂. Essa característica também foi observada por Paiva et al, (2017) ao avaliarem o desempenho do imunossensor a parti de um substrato de ouro modificado apenas com CS₂, analisado por SPR, sugerem que as moléculas de CS₂ cobrem toda a superfície, estabelecendo uma forte interação com o ouro impedindo a adsorção física e química indesejada. Esse comportamento pode justificar o aumento da frequência observado neste estudo, no final da etapa de bloqueio (etapa III, fig. 11) por, possivelmente, não ter espaços livres para adsorção da albumina na superfície do sensor, sendo eliminados com a lavagem tanto a solução de bloqueio, quanto antígenos rA₂ ligados fracamente na etapa II, elevando assim a frequência de ressonância.

Por outro lado, embora possibilite menos etapas para imobilização do biomaterial e capacidade para evitar adsorção inespecífica de proteínas, o uso de CS₂ puro para funcionalização de superfície de ouro pode interferir na reatividade do sensor por diminuir a interação entre o terminal (-N) das aminas e o terminal (-C) do dissulfeto de carbono quando fixado ao ouro (PAIVA et al, 2017). Almeida; Cascalheira e Viana (2010), esclarecem que ao ligar-se ao ouro, o CS₂ gera um dipolo negativo (δ^-) muito grande em torno dos S, que abrange a estrutura de ressonância formada, fazendo com que o dipolo positivo (δ^+) do C diminua, e em

consequência quando a amina vai ligar-se ao C este já não apresenta tanta necessidade em receber os elétrons do N e por isso a ligação N-C provavelmente não ocorre em grande extensão.

Neste estudo, a possibilidade de interações inespecíficas presente no material analisado, manteve a escolha pelo uso de solução aquosa de CS₂ puro, por deixar o sensor mais susceptível ao resultado, obtendo sinal favorável, indicativo de imobilização do antígeno rA2 (etapa II, fig. 11). Em abordagem futura pode ser estabelecido alternativas para melhorar o sinal do sensor conforme realizado por Niu et al (2012) que usou solução aquosa mista de CS₂ e proteína A ou como Paiva et al (2017) pela modificação da superfície de ouro com nanoconjugados de ditiocarbamato de proteína A, pelo uso de CS₂, proteína A e nanopartículas de ouro (AuNPs).

Os imunossensores traduzem a interação antígeno-anticorpo diretamente pela mudança na frequência do QCM (LEE; CHANG, 2005). Eun et al (2002), sugerem que afinidade de um antígeno com o anticorpo pode ser medida pela variação da frequência de oscilação do sensor, sendo efetiva quando gera a diminuição da frequência de oscilação ressonante do cristal. O resultado obtido para amostra de gato positiva para *Leishmania infantum* mostrou um decréscimo na frequência de oscilação do sistema, assim sugerindo a interação dos anticorpos presentes na amostra com o antígeno A2 adsorvido ao sensor. Desta forma, o padrão de resposta sugere resultado satisfatório para o biossensor testado, pois a amostra positiva mostrou interação com o antígeno imobilizado.

Em termos de perspectivas futuras, é importante realizar testes com amostras negativas para avaliar o padrão de variação da frequência de oscilação; estabelecer os limites de detecção para os anticorpos em análise, por meio da titulação da amostra; comparar desempenho com outro método convencional de imunoenensaio, como avaliado em outros experimentos com imunossensor para detecção de leishmaniose (CABRAL-MIRANDA et al, 2014; RAMOS-JESUS et al, 2016; CORDEIRO et al, 2020).

Em relação ao desempenho das plataformas imunossensoras aplicadas neste estudo, observou-se que a imobilização do antígeno recombinante A2 e posterior captura de anticorpos anti-antígeno A2 *L. infantum* monitoradas por meio de QCM em tempo real, foi possível tanto no método por adsorção simples quanto por formação de SAM de CS₂. No entanto, ao método de imobilização mediada por CS₂ existe a possibilidade de melhoramento do sinal por implementação do protocolo conforme adotado por Niu et al (2012) com aplicação de CS₂ e proteína A, podendo favorecer a reatividade do sensor e assim aperfeiçoar seu desempenho.

6 CONCLUSÃO

Os imunossensores aplicados neste estudo apresentaram um padrão de resposta indicativo de detecção de anticorpos anti-antígeno A2 de *L. infantum* presente em soro felino a partir da imobilização de antígeno recombinante A2 0,1 mg/mL, podendo embasar a realização de outras pesquisas para validação do imunossensor no diagnóstico da leishmaniose em gatos.

Desta forma, os resultados obtidos por estes imunossensores geram perspectivas quanto ao seu potencial para aplicação na triagem de amostras sorológicas de gatos em áreas endêmicas, podendo ajudar a compreender a participação desses na epidemiologia da leishmaniose visceral e, conseqüentemente, contribuir para seu monitoramento e controle, sendo uma ferramenta promissora para auxiliar estudos epidemiológicos e diagnósticos clínicos da doença em felinos.

REFERÊNCIAS

- ABRAMO, F. et al. Skin Lesions in Feline Leishmaniosis: A Systematic Review. **Pathogens**, v. 10, n. 4, p. 472, 2021.
- AFZAL, A. et al. Gravimetric viral diagnostics: QCM based biosensors for early detection of viruses. **Chemosensors**, v. 5, n. 1, p. 7, 2017.
- AGUIAR, G. M.; VIEIRA, V. R. Distribuição Regional e Habitats de Espécies de Flebotomíneos Brasileiros. In: Rangel E., Shaw J. (eds) **Brazilian Sand Flies**. Springer, Cham. p. 251-298, 2018.
- AKHOUNDI, M. et al. A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of *Leishmania* Parasites and Sandflies. **PLoS negligenciou doenças tropicais**, v. 10, n. 3, p. e0004349, 2016.
- AKHTARDANESH, B. et al. Low susceptibility of domestic cats to experimental *Leishmania infantum* infection. **Journal of vector borne diseases**, v. 55, n. 3, p. 230, 2018.
- AKSULU, A. et al. Seroprevalence and molecular detection of *Leishmania* spp. in cats of West Aegean Region, Turkey. **Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports**, p. 100573, 2021.
- ALMEIDA, I.; CASCALHEIRA, A. C.; VIANA, A. S. One step gold (bio) functionalisation based on CS2-amine reaction. *Electrochimica acta*, v. 55, n. 28, p. 8686-8695, 2010
- ALVES-MARTIN, M. F. et al. Detection of *Leishmania* spp. using parasitological, serological and molecular assays in asymptomatic and sick cats from an endemic area of visceral leishmaniosis in Brazil. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, p. 659-664, 2017.
- ARYA, S. K. et al. Recent advances in self-assembled monolayers based biomolecular electronic devices. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 24, n. 9, p. 2810-2817, 2009.
- ASAL, M. et al. Recent developments in enzyme, DNA and immuno-based biosensors. **Sensors**, v. 18, n. 6, p. 1924, 2018.
- ASFARAM, S.; FAKHAR, M.; TESHNIZI, S. H. Is the cat an important reservoir host for visceral leishmaniasis? A systematic review with meta-analysis. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, Botucatu, v. 25, e20190012, 2019.
- ASGARI, Q. et al. Alarming: high prevalence of *Leishmania infantum* infection in cats from southern Iran based on molecular and serological methods. **Annales de parasitologie humaine et comparee**, v. 66, n. 2, pág. 143-56, 2020.
- AYDIN, M.; AYDIN, E. B.; SEZGINTÜRK, M. K. Advances in immunosensor technology. **Advances in Clinical Chemistry**, v. 102, p. 1-62, 2020.

BATISTA, J. F. et al. Transmission of *Leishmania infantum* from cats to dogs. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 29, n. 4, 2020.

BEZERRA, J. A. B. et al. Serological and molecular investigation of *Leishmania* spp. infection in cats from an area endemic for canine and human leishmaniasis in Northeast Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 28, n. 4, p. 790-796, 2019.

BHAKTA, S. A et al. Adsorção de proteínas em nanomateriais para o desenvolvimento de biossensores e dispositivos analíticos: uma revisão. **Analytica chimica acta**, 872, 7-25, 2015.

BOHLI, N. et al. Imunossensor impedimétrico baseado em nanopartículas de ouro funcionalizado com anticorpos: Métodos de detecção para melhor sensibilidade. **Micro & Nano Letters**, v.14, n. 6, p. 629-633, 2019.

BOUTSINI, S. et al. Phlebotomine sandflies and factors associated with their abundance in the leishmaniasis endemic area of Attiki, Greece. **Parasitology research**, v. 117, n. 1, p. 107-113, 2018.

BRAGAZZI, N. L. et al. Quartz-crystal microbalance (QCM) for public health: An overview of its applications. **Advances in protein chemistry and structural biology**, v. 101, p. 149-211, 2015.

BRASIL, R. P.; BRASIL, B. G. Bionomy: Biology of Neotropical Phlebotomine Sand Flies. In: Rangel E., Shaw J. (eds) **Brazilian Sand Flies**. Springer, Cham. p. 299-318, 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Coordenação-Geral de Desenvolvimento da Epidemiologia em Serviços. **Guia de Vigilância em Saúde: volume 3 / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Coordenação-Geral de Desenvolvimento da Epidemiologia em Serviços. – 1. ed. atual. – Brasília: Ministério da Saúde, 2017.**

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. – 1. ed., 5. reimpr. – Brasília: Ministério da Saúde, 2014.**

BRIANTI, E. et al. Treatment and long-term follow-up of a cat with leishmaniosis. **Parasites & vectors**, v. 12, n. 1, p. 1-7, 2019.

CABRAL-MIRANDA, G. et al. Detection of parasite antigens in *Leishmania infantum*-infected spleen tissue by monoclonal antibody-, piezoelectric-based immunosensors. **Journal of Parasitology**, v.100, n.1, p.73-78, 2014.

CALDART, E. T. et al. Diagnóstico sorológico de *Leishmanias* spp. em felinos e reação cruzada/coinfecção com *Toxoplasma gondii* e *Trypanosoma* spp. **Revista de Ciência Veterinária e Saúde Pública**, v. 3, p. 166-169, 2016.

CAN, H. et al. Seroprevalence of *Leishmania* infection and molecular detection of *Leishmania tropica* and *Leishmania infantum* in stray cats of İzmir, Turkey. **Experimental parasitology**, v. 167, p. 109-114, 2016.

- CARDOSO, L. et al. New Epidemiological Aspects of Animal Leishmaniasis in Europe: The Role of Vertebrate Hosts Other Than Dogs. **Pathogens**, v. 10, n. 3, p. 307, 2021.
- CARNEIRO, L. A. et al. First report on feline leishmaniasis caused by *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in Amazonian Brazil. **Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports**, v. 19, p. 100360, 2020.
- CARVALHO, F. A. et al. Diagnosis of American visceral leishmaniasis in humans and dogs using the recombinant *Leishmania donovani* A2 antigen. **Diagnostic microbiology and infectious disease**, v. 43, n. 4, p. 289-295, 2002.
- CHAPMAN, E. et al. Researching Surfaces That Resist Protein Adsorption, **Journal of the American Chemical Society**, 122, 8303-8304, 2000.
- CHAREST, H.; MATLASHEWSKI, G. Expressão gênica desenvolvimental em *Leishmania donovani*: clonagem diferencial e análise de um gene específico do estágio amastigota. **Biologia molecular e celular**, v. 14, n. 5, pág. 2975-2984, 1994
- CHATZIS, M. K. et al. Evaluation of clinicopathological abnormalities in sick cats naturally infected by *Leishmania infantum*. **Heliyon**, v. 6, n. 10, p. e05177, 2020.
- CORDEIRO, T. A. R. et al. Impedimetric immunosensor for rapid and simultaneous detection of chagas and visceral leishmaniasis for point of care diagnosis. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 169, p. 112573, 2020.
- COSTA, T. A. C. et al. Ocorrência de leishmaniose em gatos de área endêmica para leishmaniose visceral. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 47, n. 3, p. 213-217, 2010.
- COSTA-VAL, A. P. et al. Serological study of feline leishmaniasis and molecular detection of *Leishmania infantum* and *Leishmania braziliensis* in cats (*Felis catus*). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v. 29, n. 2, e003520, 2020.
- COTTON, J. A. The expanding world of human leishmaniasis. **Trends in parasitology**, v. 33, n. 5, p. 341-344, 2017.
- COURA, F. M. et al. Serological, molecular, and microscopic detection of *Leishmania* in cats (*Felis catus*) in Belo Horizonte, Minas Gerais State, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 27, p. 570-574, 2018.
- DAMOS, F. S.; MENDES, R. K.; KUBOTA, L. T. Aplicações de QCM, EIS e SPR na investigação de superfícies e interfaces para o desenvolvimento de (bio)sensores. **Química Nova**, v.27, n.6, p.970-979, 2004.
- DEDOLA, C. et al. Serological and molecular detection of *Leishmania infantum* in cats of Northern Sardinia, Italy. **Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports**, v. 13, p. 120-123, 2018.

- DIAKOU, A. et al. Intestinal parasites and vector-borne pathogens in stray and free-roaming cats living in continental and insular Greece. **PLoS neglected tropical diseases**, v.11, n.1, p. e0005335, 2017.
- DILTEMIZ, S. E. et al. 4-Aminophenyl boronic acid modified gold platforms for influenza diagnosis. **Materials Science and Engineering: C**, v. 33, n. 2, p. 824-830, 2013.
- DOLATSHAHI-PIROUZ, A. et al. Bovine serum albumin adsorption on nano-rough platinum surfaces studied by QCM-D. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 66, n. 1, p. 53-59, 2008.
- EP SOUTO, D. et al. Using QCM and SPR for the kinetic evaluation of the binding between a new recombinant chimeric protein and specific antibodies of the visceral leishmaniasis. **Current Protein and Peptide Science**, v. 16, n. 8, p. 782-790, 2015.
- EUN, A. J. C. et al. Detection of two orchid viruses using quartz crystal microbalance (QCM) immunosensors. **Journal of Virological Methods**, v.99, n.1-2, p. 71-79, 2002.
- FONSECA, I.P. et al. Leishmaniose Felina. Medicina Veterinária – **RAEFMV**, v. 67, p.15-25, 2013.
- FAHLIYANI, S. A. et al. Microbially derived biosensors for diagnosis, monitoring, and epidemiology for future biomedicine systems. In: **New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering**. Elsevier, p. 43-65, 2020.
- FELIX, F. S.; ANGNES, L. Electrochemical immunosensors—a powerful tool for analytical applications. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 102, p. 470-478, 2018.
- FERNÁNDEZ-ARÉVALO, A. et al. The *Leishmania donovani* species complex: A new insight into taxonomy. **International Journal for Parasitology**, v. 50, n. 13, p. 1079-1088, 2020.
- FERNANDEZ-GALLEGO, A. et al. Feline leishmaniosis: diagnosis, treatment and outcome in 16 cats. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 22, n. 10, p. 993–1007, 2020.
- FERREIRA, T. S. et al. High molecular prevalence of *Leishmania* in phlebotomine sand flies fed on chicken blood in Brazil. **Veterinary parasitology**, v. 259, p. 80-84, 2018.
- FIGUEIREDO, F. B. et al. Serological diagnosis of feline tegumentary leishmaniasis by indirect immunofluorescence (IFI) and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) in an endemic area in Brazil. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 44, n. 1, p. 7, 2016.
- GAO, X.; CAO, Z. Condições meteorológicas, altitude e cobertura do solo como preditores para a análise da distribuição da leishmaniose visceral na província de Sinkiang, China Continental. **Science of The Total Environment**, 646 (), 1111-1116, 2019.
- GHEDIN, E. et al. Resposta de anticorpos contra uma proteína específica do estágio de amastigota de *Leishmania donovani* em pacientes com leishmaniose visceral. **Clinical Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 4, n. 5, pág. 530-535, 1997.

- GONZÁLEZ, E. et al. Phlebotomine sand fly survey in the focus of leishmaniasis in Madrid, Spain (2012–2014): seasonal dynamics, *Leishmania infantum* infection rates and blood meal preferences. **Parasites & vectors**, v. 10, n. 1, p. 1-14, 2017.
- GUIMARÃES-E-SILVA, A. S. et al. **Leishmania** infection and blood food sources of phlebotomines in an area of Brazil endemic for visceral and tegumentary leishmaniasis. **PLoS One**, v. 12, n. 8, p. e0179052, 2017.
- HARHAY, M. O. et al. Urban parasitology: visceral leishmaniasis in Brazil. **Trends Parasitol**, v. 27, p. 403-409, set. 2011.
- HEADLEY, S. A. et al. Immunohistochemical characterization of cutaneous leishmaniasis in cats from Central-west Brazil. **Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports**, v. 17, p. 100290, 2019.
- HONG, A. et al. One health approach to leishmaniasis: Understanding the disease dynamics through diagnostic tools. **Pathogens**, v. 9, n. 10, p. 809, 2020.
- IATTA, R. et al. A nationwide survey of *Leishmania infantum* infection in cats and associated risk factors in Italy. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 13, n. 7, p. e0007594, 2019.
- JACHIMSKA, B. et al. Eficácia de adsorção de β -lactoglobulina na superfície de ouro determinada por microbalança de cristal de quartzo. **Bioelectrochemistry**, v. 121, p. 95-104, 2018.
- JIN, Y. et al. Probing the dynamic interaction between damaged DNA and a cellular responsive protein using a piezoelectric mass biosensor. **ACS applied materials & interfaces**, v. 9, n. 10, p. 8490-8497, 2017.
- JOHANNSMANN, D. Essentials of Viscoelasticity. In: **The Quartz Crystal Microbalance in Soft Matter Research. Soft and Biological Matter**. Springer, Cham, p. 33-47, 2015.
- JUNG, Y.; JEONG, JY.; CHUNG, BH. Avanços recentes nos métodos de imobilização de anticorpos em suportes sólidos. **Analista**, 133 (6), 697-701, 2008.
- JUSI, M. M. G. et al. Expression of a recombinant protein, A2 family, from *Leishmania infantum* (Jaboticabal strain) and its evaluation in Canine Visceral Leishmaniasis serological test. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 24, p. 309-316, 2015.
- KARCZMARCZYK, A.; HAUPT, K.; FELLER, KH. Desenvolvimento de um biossensor QCM-D para detecção de ocratoxina A em vinho tinto. **Talanta**, v. 166, p. 193-197, 2017.
- KLUTSE, C. K. et al. Applications of self-assembled monolayers in surface-enhanced Raman scattering. **Journal of Nanotechnology**, v. 2012, 2012.
- LEAL, R. O. et al. Granulomatous rhinitis secondary to feline leishmaniasis: report of an unusual presentation and therapeutic complications. **Journal of Feline Medicine and Surgery Open Reports**, v. 4, n. 2, p. 2055116918811374, 2018.

LEE, Yuan-Guey; CHANG, Ku-Shang. Application of a flow type quartz crystal microbalance immunosensor for real time determination of cattle bovine ephemeral fever virus in liquid. **Talanta**, v. 65, n. 5, p. 1335-1342, 2005.

LÉVÊQUE, M. F. et al. Place of serology in the diagnosis of zoonotic leishmaniasis with a focus on visceral leishmaniasis due to *Leishmania infantum*. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 10, p. 67, 2020.

LIM, H. J. et al. Quartz crystal microbalance-based biosensors as rapid diagnostic devices for infectious diseases. **Biosensors and Bioelectronics**, p. 112513, 2020.

LONGONI, S. S. et al. Detection of different *Leishmania* spp. and *Trypanosoma cruzi* antibodies in cats from the Yucatan Peninsula (Mexico) using an iron superoxide dismutase excreted as antigen. **Comparative immunology, microbiology and infectious diseases**, v. 35, n. 5, p. 469-476, 2012.

MACKAY, D.; KELLY, E.; NOONEY, R. Modelling random antibody adsorption and immunoassay activity. **Mathematical Biosciences & Engineering**, v. 13, n. 6, p. 1159, 2016.

MADRUGA, G. et al. Ocular manifestations of leishmaniasis in a cat: first case report from Brazil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v.70 n.5 Belo Horizonte Sept./Oct. 2018.

MAIA, C.; CAMPINO, L. Methods for diagnosis of canine leishmaniasis and immune response to infection. **Veterinary parasitology**, v. 158, n.4, p.274-287, 2008.

MAIA, C. et al. Feline *Leishmania* infection in a canine leishmaniasis endemic region, Portugal. **Veterinary parasitology**, v. 174, n. 3-4, p. 336-340, 2010.

MAKARAVICIUTE, A.; RAMANAVICIENE, A. Técnicas de imobilização de anticorpos dirigidos ao local para imunossensores. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 50, p. 460-471, 2013.

MANCIANTI, F. Feline leishmaniasis: what's the epidemiological role of the cat? **Parasitologia**, v. 46, n. 1-2, p. 203-206, 2004.

MARTINS, B. R. et al. Development of an electrochemical immunosensor for specific detection of visceral leishmaniasis using gold-modified screen-printed carbon electrodes. **Biosensors**, v. 10, n. 8, p. 81, 2020.

MCGWIRE, B. Satoskar; SATOSKAR, A. R. Leishmaniasis: clinical syndromes and treatment. **QJM: An International Journal of Medicine**, v. 107, n. 1, p. 7-14, 2014.

MEDYANTSEVA, E. P.; KHALDEEVA, E. V.; BUDNIKOV, G. K. Immunosensors in biology and medicine: analytical capabilities, problems, and prospects. **Journal of Analytical Chemistry**, v. 56, n. 10, p. 886-900, 2001.

MENDONÇA, I. L. et al. Infection of *Lutzomyia longipalpis* in cats infected with *Leishmania infantum*. **Veterinary parasitology**, v. 280, p. 109058, 2020.

- METZDORF, I. P. et al. Molecular characterization of *Leishmania infantum* in domestic cats in a region of Brazil endemic for human and canine visceral leishmaniasis. **Acta Tropica**, v.166, p.121-125, 2017.
- MIGLIAZZO, A. et al. Leishmaniose felina: um caso com uma alta carga parasitária. **Veterinario. Dermatol**, v. 26, n. 1, p. 69-70, 2015.
- MIRÓ, G. et al. Current status of *L. infantum* infection in stray cats in the Madrid region (Spain): implications for the recent outbreak of human leishmaniasis? **Parasitas e vetores**, v. 7, n. 1, pág. 1-7, 2014.
- MOHANKUMAR, P. et al. Recent developments in biosensors for healthcare and biomedical applications: A review. **Measurement**, v. 167, p. 108293, 2021.
- MOHEBALI, M. et al. Feline leishmaniasis due to *Leishmania infantum* in Northwest Iran: The role of cats in endemic areas of visceral leishmaniasis. **Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports**, v. 9, p. 13-16, 2017.
- MONDOLFI, A. P. et al. Autochthonous cutaneous leishmaniasis in urban domestic animals (*Felis catus/Canis lupus familiaris*) from central-western Venezuela. **Acta tropica**, v. 191, p. 252-260, 2019.
- MOORE, et al. Development of a rapid single-drop analysis biosensor for screening of phenanthrene in water samples. **Electroanalysis: An International Journal Devoted to Fundamental and Practical Aspects of Electroanalysis**.v.16, n. 20, p.1653-1659, 2004.
- NGUYEN, H. H. et al. Immobilized enzymes in biosensor applications. **Materials**, v. 12, n. 1, p. 121, 2019.
- BHALLA, N. et al. Introduction to biosensors. **Essays Biochem**, v. 60, n. 1, p. 1-8, 2016.
- NIU, Y. et al. Antibody oriented immobilization on gold using the reaction between carbon disulfide and amine groups and its application in immunosensing. **Langmuir**, v. 28, n. 51, p. 17718-17725, 2012.
- NOÉ, P. et al. Detection of *Leishmania chagasi* in cats (*Felis catus*) from viscera leishmaniasis endemic area in Brazil. **Ciência Animal**, v. 25, n. 4, p. 3-14, 2015.
- NOVAETECH, S. **OpenQCM**. Disponível em: <<https://store.openqcm.com/10-mhz-quartz-sensors-box-for-liquid-biosensing-10-pieces.html>>. Acesso em: 03 ago 2021.
- NUNES, G. S.; MARTY, J. L. Immobilization of enzymes on electrodes. In: **Immobilization of Enzymes and Cells**. Humana Press, p. 239-250, 2006.
- OLIVEIRA, A. F.; PEREIRA, A. Biosensor and Food Industry-Review. **Revista Virtual de Química**, v. 8, n. 5, p. 1311-1333, 2016.
- OLIVEIRA, T. M. F. S. et al. **Leishmaniose Felina no Brasil**. In: MELCHIOR, L. A. K.; SILVA MALAVAZI, P. F. N.; CAMARGO, L. M. A.; OLIVEIRA, J.; MENEGUETTI, D. U.

O. Atualidades em Medicina Tropical no Brasil: Veterinária. Rio Branco: Stricto Sensu, p. 126-144, 2020.

OLIVIER, M.; ZAMBONI, D. S. *Leishmania Viannia guyanensis*, LRV1 virus and extracellular vesicles: a dangerous trio influencing the faith of immune response during mucocutaneous leishmaniasis. **Current Opinion in Immunology**, Philadelphia, v. 66, p. 108–113, 2020. Disponível em:< <https://doi.org/10.1016/j.coi.2020.08.004>>. Acesso em 4 de mai. 2021.

OPAS, O. D. S. Manual de procedimientos para vigilancia y control de las leishmaniasis en las Américas. OD Salomon, F. Edilson Ferreira Lima Jr RA e S, organizador. **OPAS Organización Pan Americana de Saúde**. Washington: OPAS, 2019.

OPAS, O. D. S. Atlas interactivo de leishmaniasis en las Américas: aspectos clínicos y diagnósticos diferenciales. **Organización Panamericana de la Salud**. Washington: OPAS, 2020.

OTRANTO, D. et al. Feline and canine leishmaniosis and other vector-borne diseases in the Aeolian Islands: pathogen and vector circulation in a confined environment. **Veterinary parasitology**, v. 236, p. 144-151, 2017.

PAIVA, T. O. et al. Nanostructured interfaces with site-specific bioreceptors for immunosensing. **Applied Surface Science**, v. 412, p. 455-463, 2017.

PANDEY, C. M.; MALHOTRA, B. D. Biorecognition Elements in a Biosensor. **Biosensors**, Berlin, Boston: De Gruyter, pp. 19-36, 2019.

PARK, et al. Comparison of stabilizing effect of stabilizers for immobilized antibodies on QCM immunosensors. **Sensors and Actuators B: Chemical**. v. 91, n.1-3, p.158-162, 2003.

PENNISI, M. G. Leishmaniosis of companion animals in Europe: an update. **Veterinary parasitology**, v. 208, n. 1-2, p. 35-47, 2015.

PENNISI, M. G. et al. LeishVet update and recommendations on feline leishmaniosis. **Parasites & vectors**, v. 8, n. 1, p. 1-18, 2015.

PENNISI, M. G.; PERSICHETTI, M. F. Feline leishmaniosis: Is the cat a small dog?. **Veterinary parasitology**, v. 251, p. 131-137, 2018.

PEREIRA, A.; MAIA, C. Infecção por *Leishmania* em gatos e leishmaniose felina: uma revisão atualizada com uma proposta de algoritmo de diagnóstico e diretrizes de prevenção. **Current Research in Parasitology & Vector-Borne Diseases**, p. 100035, 2021.

PEREIRA, A. et al. Phylogenetic insights on *Leishmania* detected in cats as revealed by nucleotide sequence analysis of multiple genetic markers. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 77, p. 104069, 2020.

PERINOTO, A. C. et al. Biosensors for efficient diagnosis of leishmaniasis: innovations in bioanalytics for a neglected disease. **Analytical chemistry**, v. 82, n. 23, p. 9763-9768, 2010.

- PERUMAL, V.; HASHIM, U. Advances in biosensors: Principle, architecture and applications. **Journal of applied biomedicine**, v. 12, n. 1, p. 1-15, 2014.
- PIMENTA, P. F. P. et al. Biologia da Interação *Leishmania* –Sand Fly. In: Rangel E., Shaw J. (eds) **Brazilian Sand Flies**. Springer, Cham. p. 319-339, 2018.
- PIMENTA, P. et al. Feline leishmaniosis in Portugal: 3 cases (year 2014). **Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports**, v. 1, p. 65-69, 2015.
- PIRAJÁ, G. V. et al. Leishmaniose felina: revisão de literatura. **Veterinária e Zootecnia**, v.20, n.2, p. 203-216, 2013
- PIRICH, C. L. et al. Piezoelectric immunochip coated with thin films of bacterial cellulose nanocrystals for dengue detection. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 92, p. 47-53, 2017.
- POHANKA, M. Overview of piezoelectric biosensors, immunosensors and DNA sensors and their applications. **Materials**, v. 11, n. 3, p. 448, 2018.
- POHANKA, M. The piezoelectric biosensors: Principles and applications. **Int. J. Electrochem. Sci**, v. 12, p. 496-506, 2017.
- POITRAS, C.; FATISSON, J.; TUFENKJI, N. Real-time microgravimetric quantification of *Cryptosporidium parvum* in the presence of potential interferents. **Water research**, v. 43, n. 10, p. 2631-2638, 2009.
- PORROZZI, R. et al. Comparative evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays based on crude and recombinant leishmanial antigens for serodiagnosis of symptomatic and asymptomatic *Leishmania infantum* visceral infections in dogs. **Clinical and vaccine immunology**, v. 14, n. 5, p. 544-548, 2007.
- QUEIROZ, N. M. et al. Diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina pelas técnicas de imunoistoquímica e PCR em tecidos cutâneos sem associação com a RIFI e ELISA-teste. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v. 19, n. 1, p. 32-38, jan.-mar. 2010.
- RAMOS-JESUS, J. et al. A piezoelectric immunosensor for *Leishmania chagasi* antibodies in canine serum. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 401, n. 3, p. 917-925, 2011.
- RAMOS-JESUS, J. et al. A gold nanoparticle piezoelectric immunosensor using a recombinant antigen for detecting *Leishmania infantum* antibodies in canine serum. **Biochemical Engineering Journal**, v. 110, p. 43-50, 2016.
- REIS, L. L. D. et al. Leishmaniose visceral e sua relação com fatores climáticos e ambientais no Estado do Tocantins, Brasil, 2007 a 2014. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 35, p. e00047018, 2019.
- ROCHA, A. V. V. O. et al. Diagnosis and epidemiology of *Leishmania infantum* in domestic cats in an endemic area of the Amazon region, Brazil. **Veterinary parasitology**, v. 273, p. 80-85, 2019.

- RODOVALHO, V. R. B. M. et al. Biosensors applied to diagnosis of infectious diseases—An update. **Austin J Biosens & Bioelectron**, v. 1, n. 3, p. 1015, 2015.
- SALES, K. G. S. et al. Identification of phlebotomine sand fly blood meals by real-time PCR. **Parasites & vectors**, v. 8, n. 1, p. 1-6, 2015.
- SALOMÃO, P. E. A. Produção e Aplicação de Biossensores: Uma Breve Revisão. **Research, Society and Development**, v. 7, n. 3, p. 1, 2018.
- SÁNCHEZ, J. L. A. et al. Introdução dirigida ao local de grupos dissulfeto em anticorpos para imunossensores altamente sensíveis. **Química analítica e bioanalítica**, v. 408, n.19, pág. 5337-5346, 2016.
- SANGEETHA, P.; JULIET, A. Vimala. Método de leitura para detecção de patógenos usando biossensor. In: **Conferência Internacional sobre Comunicação da Informação e Sistemas Embarcados (ICICES2014)**. IEEE, p.1-6, 2014.
- SANTOS, C. M. et al. Análise citológica para diagnóstico de leishmaniose em um gato oligossintomático em área endêmica, Campo Grande, MS, Brasil. **Brazilian Journal of Animal and Environmental Research**, v. 1, n. 1, p. 59-71, 2018.
- SANTOS, I. F. C.; ALBERTO, D. S. Proteínas de fase aguda em cães e gatos. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR**. UNIPAR, Umuarama, v. 17, n. 1, p. 55-62, jan./mar. 2014.
- SAUERBREY, G. Use of quartz vibrator for weighting thin films on a microbalance. **Zeitschrift fur Physik**, v. 155, p. 206-212, 1959.
- SAWANT, S. N. Desenvolvimento de biossensores a partir de compósitos biopolímeros. In: **Compósitos de biopolímero em eletrônica**. Elsevier, p.353-383. 2017.
- SEQUEIRA, C. I. L. **Infeção por *Leishmania spp.*/Leishmaniose em gatos na Península de Setúbal**. Tese de Doutorado. Universidade de Lisboa, Faculdade de Medicina Veterinária. 88f. 2021.
- SERGENT, E. et al. La leishmaniose à Alger. Infection simultanée d'un enfant, d'un chien et d'un chat dans la même habitation. **Bulletin de la Société de Pathologie Exotique**, v. 5, p. 93-98, 1912.
- SHARMA, M. K. et al. A novel piezoelectric immunosensor for the detection of malarial *Plasmodium falciparum* histidine rich protein-2 antigen. **Talanta**, v. 85, n. 4, p. 1812-1817, 2011.
- SILVA, D. T. **Avaliação da resposta imune de gatos naturalmente infectados por *Leishmania (Leishmania) infantum***. [Evaluation of the immune response of cats naturally infected with *Leishmania (Leishmania) infantum*]. 2019. 120p. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

SILVA, K. B. et al. Flutuação sazonal e frequência horária de flebotomíneos numa área urbana de Sobral, Ceará, Brasil. **SaBios-Revista de Saúde e Biologia**, v. 13, n. 1, p. 12-20, 2018.

SILVA, R. B. S. et al. Natural Infection by *Leishmania infantum* in domestic cats (*Felis catus*) in a municipality of moderate transmission in the Brazilian semi-arid region. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 29, n. 4, 2020.

SILVA, R. D. C. N. et al. Detection of antibodies against *Leishmania infantum* in cats (*Felis catus*) from the State of Pernambuco, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 47, n. 1, p. 108-109, 2014.

SILVA, S. M. et al. First report of infection of *Lutzomyia longipalpis* by *Leishmania (Leishmania) infantum* from a naturally infected cat of Brazil. **Veterinary parasitology**, v. 174, n. 1-2, p. 150-154, 2010.

SKLÁDAL, P. Piezoelectric biosensors. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 79, p. 127-133, 2016.

SOARES, C. S. A.; DUARTE, S. C.; SOUSA, S. R. What do we know about feline leishmaniosis?. **Journal of feline medicine and surgery**, v. 18, n. 6, p. 435-442, 2015.

SOUSA, S. A. P. et al. Acute visceral leishmaniasis in a domestic cat (*Felis silvestris catus*) from the state of Tocantins, Brazil. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 40, n. 4, p. 1723-1730, 2019.

SPADA, E. et al. Feline *Leishmania* spp. infection in a non-endemic area of northern Italy. **Animals**, v. 10, n. 5, p. 817, 2020.

SVOBODOVA, V. et al. Canine leishmaniosis in three consecutive generations of dogs in Czech Republic. **Veterinary parasitology**, v. 237, p. 122-124, 2017.

TELES, F. S. R. R.; TAVIRA, L. A. P. T.; FONSECA, L. J. P. Biosensors as rapid diagnostic tests for tropical diseases. **Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences**, v. 47, n. 3, p. 139-169, 2010.

VASHIST, Sandeep Kumar; VASHIST, Priya. Recent advances in quartz crystal microbalance-based sensors. **Jornal de sensores**, v. 2011, 2011

VENTURA, B. D. et al. Effective antibodies immobilization and functionalized nanoparticles in a quartz-crystal microbalance-based immunosensor for the detection of parathion. **PLoS One**, v. 12, n. 2, p. e0171754, 2017.

WANG, L. et al. QCM-based aptamer selection and detection of *Salmonella typhimurium*. **Food chemistry**, v. 221, p. 776-782, 2017.

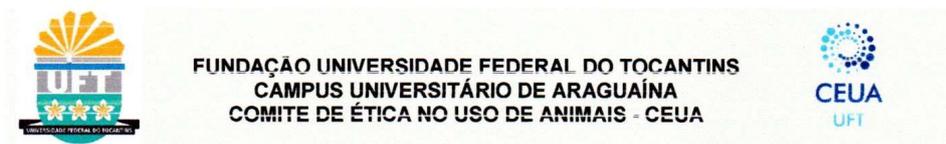
WHO, World Health Organization. **Leishmaniosis** [internet]. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>. Acesso em: 17 de out de 2020.

ZHANG, L. Q. et al. Sensitive electrogravimetric immunoassay of hepatitis B surface antigen through hyperbranched polymer bridge linked to multiple secondary antibodies. **Chemical Papers**, v. 70, n. 8, p. 1031-1038, 2016.

ZHANG, W. W. et al. Identificação e superexpressão da proteína específica do amastigota A2 em *Leishmania donovani*. *Parasitologia molecular e bioquímica*, v. 78, n.1-2, pág.79-90, 1996.

ZU, H.; WU, H.; WANG, Q. M. High-temperature piezoelectric crystals for acoustic wave sensor applications. **IEEE transactions on ultrasonics, ferroelectrics, and frequency control**, v. 63, n. 3, p. 486-505, 2016.

ANEXO A – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA



Araguaína, 10 de agosto de 2020.

O projeto intitulado “**DESENVOLVIMENTO DE IMUNOSSENSOR PIEZOELÉTRICO PARA IDENTIFICAÇÃO DE LEISHMANIOSE EM FELINOS**” processo nº 23.101.002.458/2020-12 sob a responsabilidade Katyane de Sousa Almeida está de acordo com as normas éticas estabelecidas pela lei de Procedimentos para o Uso Científico de Animais, de 8 de outubro de 2008, estando aprovado para a sua execução pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Tocantins.

Atenciosamente,

CEUA/UFT