

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

DESENVOLVIMENTO DE IMUNOSENSOR BASEADO
NA IMOBILIZAÇÃO DE ANTICORPO MONOCLONAL
EM FIBROÍNA DA SEDA PARA DIAGNÓSTICO RÁPIDO
DA CISTICERCOSE BOVINA

JOSY CAMPANHÃ VICENTINI DE OLIVEIRA

BOTUCATU, SP

Dez/ 2014

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

DESENVOLVIMENTO DE IMUNOSENSOR BASEADO NA
IMOBILIZAÇÃO DE ANTICORPO MONOCLONAL EM FIBROÍNA
DA SEDA PARA DIAGNÓSTICO RÁPIDO DA CISTICERCOSE
BOVINA

JOSY CAMPANHÃ VICENTINI DE OLIVEIRA

Tese apresentada junto ao Programa
de Pós-Graduação em Medicina
Veterinária para obtenção do título de
Doutor.

Orientador: Prof. Dr. Germano
Francisco Biondi

Co-Orientador: Prof^a. Dr^a. Elenice
Deffune

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Oliveira, Josy Campanhã Vicentini de.

Desenvolvimento de imunossensor baseado na imobilização de anticorpo monoclonal em fibroína da seda para diagnóstico rápido da cisticercose bovina / Josy Campanhã Vicentini de Oliveira. - Botucatu, 2014

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Orientador: Germano Francisco Biondi

Coorientador: Elenice Deffune

Capes: 50505009

1. Cisticercose - Tratamento. 2. Bovino - Doenças. 3. Anticorpos monoclonais. 4. Taenia. 5. Biossensores.

Palavras-chave: Anticorpo monoclonal; Cisticercose bovina; Fibroína da seda; Imunossensor; Taenia saginata.

Nome do Autor: Josy Campanhã Vicentini de Oliveira

Título: DESENVOLVIMENTO DE IMUNOSSENSOR BASEADO NA IMOBILIZAÇÃO DE ANTICORPO MONOCLONAL EM FIBROÍNA DA SEDA PARA DIAGNÓSTICO RÁPIDO DA CISTICERCOSE BOVINA

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Germano Francisco Biondi

Presidente e Orientador

Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP – Botucatu/SP

Prof^a. Dr^a. Cáris Maroni Nunes

Membro

Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP – Araçatuba/SP

Prof^a. Dr^a. Márjorie de Assis Golim

Membro

Departamento do Hemocentro de Botucatu/ FMB/ UNESP

Faculdade de Medicina – UNESP – Botucatu/SP

Prof^a. Dr^a. Marli Leite de Moraes

Membro

Departamento de Engenharia e Ciência de Materiais

Instituto de Ciência e Tecnologia – UNIFESP – São José do Campos/SP

Prof. Dr. Milton Hissashi Yamamura

Membro

Departamento de Medicina Veterinária Preventiva

Universidade Estadual de Londrina – UEL – Londrina/PR

Data da defesa: 05 de dezembro de 2014

Dedicatória

Dedico este trabalho

Aos meus pais, Alda Maria e Luiz Gonzaga, que sempre incentivaram a mim e a meus irmãos aos estudos,

Aos meus irmãos Fernando, Marcelo, Renata, Luíza e Luiz Gonzaga Filho, sempre companheiros nos momentos alegres e difíceis,

Ao meu amado esposo, João Guilherme, meu parceiro dedicado, carinhoso e paciente durante esses anos de trabalho,

Ao meu amado filho, Henrique, que me faz imensamente feliz por ter escolhido fazer parte da minha vida desde os últimos 6 meses. Espero ansiosa por tê-lo em meus braços, meu filho!

Agradecimientos

Os meus sinceros agradecimentos a todos que de alguma forma colaboraram e participaram deste trabalho e, em especial:

Ao meu orientador, Prof. Dr. Germano Francisco Biondi, pela confiança e por aceitar fazer parte desta caminhada.

À minha co-orientadora, Prof^a. Dr^a. Elenice Deffune, pela oportunidade de desfrutar mais quatro anos de convivência e aprendizagem.

À Prof^a. Dr^a. Rosana Rossi Ferreira pelo carinho, conselhos e apoio nos momentos de insegurança. É muito especial ter uma amiga como você!

Ao Prof. Dr. Paulo Machado pelos conselhos sábios e conversas agradáveis.

Ao Prof. Dr. Sidney J. L. Ribeiro do Instituto de Química da UNESP de Araraquara pela oportunidade de ampliar meus conhecimentos.

À Prof^a. Dra. Cárís Maroni Nunes pelos conselhos e ensinamentos, e por compreender essa minha obstinação pelo diagnóstico da cisticercose.

Ao Prof. Dr. João Pessoa A. Junior pela colaboração irrestrita e por abrir as portas do Laboratório de Virologia, permitindo a ampliação dos meus conhecimentos em Biologia Molecular.

Aos membros da banca examinadora por aceitarem participar deste momento importante e colaborar com seus conhecimentos.

Ao Laboratório de Engenharia Celular do Hemocentro de Botucatu e toda sua equipe: Dra. Elenice Deffune, Dra. Rosana R. Ferreira, Ondina Cotrin, Thaiane C. Evaristo, Helga Nunes, Henrique de Souza, Ana Cláudia Simões, Heloísa

Garcia, Isabele R. Vanni, Natália Carvalho, Camila Maleski e Ana Livia Bovolato. E aos que já fizeram parte dessa família e hoje permanecem meus amigos: Tata, Priscila Murador, Daniel B. Jesuíno, Michele J. A. Valério, Vitória Souza Mion, Woner Mion, Regina Avelina e Mariele Gobo. Meus agradecimentos pelo carinho, amizade e companheirismo de vocês!

Ao Laboratório de Citometria de Fluxo do Hemocentro de Botucatu e sua equipe: Prof^{ta}. Dr^a. Márjorie Golim, Léia, Caroline e Aline.

Aos demais funcionários, professores e alunos dos Laboratórios que compõem o Hemocentro de Botucatu que, de alguma forma, colaboraram com esta pesquisa.

Ao Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular da Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba e equipe pela parceria e convivência sempre tão agradável, em especial à Silvana Paulan e Fernanda.

Ao Laboratório de Polímeros Bernard Gross do Instituto de Física da USP de São Carlos (IFSC) por permitir e possibilitar a realização dos ensaios de crescimento do filme e análises em UV-visível e fluorescência.

Ao Laboratório de Materiais Fotônicos (LAMF) do Insituto de Química da UNESP de Araraquara e sua equipe, em especial ao Prof. Sidney Ribeiro, Denise de Salvi, Laís Roncalho e João.

Ao Instituto de Ciência e Tecnologia da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP) de São José dos Campos, em especial à Prof^{ta}. Dr^a. Marli L. de Moraes por dividir seus conhecimentos e possibilitar a realização deste trabalho.

Ao Biotério do Laboratório de Pesquisa de Doenças Tropicais da Faculdade de Medicina de Botucatu (UNIPEX), em especial ao Carlinhos, Ednelson e Talísia pela manutenção dos camundongos utilizados nos experimentos.

Ao Laboratório de Virologia do Instituto de Biociências da UNESP de Botucatu e toda equipe, em especial ao Prof. João Pessoa A. Junior e Jacqueline K. Kurissio pelos inúmeros esforços realizados em conjunto na tentativa de padronizar um teste de iPCR. Não conseguimos desta vez, mas todo o aprendizado não será desperdiçado. Meus sinceros agradecimentos.

Ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária e equipe de Apoio Administrativo: Carlos, Maria, Gláucia e Patrícia.

Ao Frigorífico Frigol (SIF-2960) e aos funcionários por contribuir com a separação das carcaças bovinas com cisticercose.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) e Rede Nanobiotec pela bolsa de estudos.

Aos animais utilizados nesta pesquisa.

Agradeço ainda à minha avó, aos meus pais, sogros, irmãos e irmãs, tios e tias, cunhados (as) e sobrinhos (as) pela torcida e pelo carinho!

A todos os meus amigos pelo incentivo.

Ao meu esposo João Guilherme pelo amor, carinho e por compreender a necessidade de minhas ausências, viagens e a dedicação a este trabalho.

Ao meu filho, ainda em meu ventre, que se manteve calmo e paciente apesar de tantas viagens e esforços pelo sucesso na finalização desta tese de doutorado.

Agradeço a Deus e ao Universo, que me proporcionaram um caminho longo e repleto de desafios, obstáculos e alegrias, responsáveis por meu crescimento espiritual e científico.

Epígrafe

“Mesmo quando tudo parece desabar, cabe a mim decidir entre rir ou chorar, ir ou ficar, desistir ou lutar; porque descobri, no caminho incerto da vida, que o mais importante é decidir “ (Cora Coralina)

“A mente que se abre a uma nova ideia jamais voltará ao seu tamanho original” (Albert Einstein)

Lista de Figuras

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1	Página
Figura 1. Mapa epidemiológico da prevalência da cisticercose bovina em bovinos abatidos nos estados brasileiros durante janeiro/ 2007 e abril/ 2010.....	07
Figura 2. Produção de hibridoma para obtenção de anticorpos monoclonais	16
Figura 3. Seleção enzimática de hibridomas utilizando suplemento HAT, pela via de síntese de nucleotídeos	17
Figura 4. Etapas principais para produção de anticorpos monoclonais..	18
Figura 5. Ilustração dos componentes de um eletrodo impresso de carbono, com um eletrodo de trabalho	20
Figura 6. Representação esquemática de um biossensor	21
Figura 7. Evolução do número de artigos publicados sobre imunossensores de 1990 a 2011 na plataforma <i>Scopus</i>	23
Figura 8. Representação esquemática da formação de filmes automontados <i>Layer-by-Layer (LbL)</i> por adsorção sequencial de polieletrólitos com cargas opostas	24
Figura 9. Micrografia eletrônica de varredura da estrutura da seda, destacando a fibroína revestida pela sericina	26
Figura 10. Ilustração dos domínios de folhas- β incorporados na matriz amorfa. Os pontos azuis representam moléculas de água	27

CAPÍTULO 2

- Figura 1.** Esquematização do procedimento de preparo dos filmes automontados via técnica *Layer-by-Layer* (camada por camada, *LbL*). As soluções 1 e 3 representam, respectivamente, a fibroína da seda e o anticorpo monoclonal e 2 e 4 representam a água ultrapura utilizada para lavagem e remoção de moléculas fracamente adsorvidas 34
- Figura 2.** Representação esquemática dos filmes *LbL* de fibroína da seda e anticorpo TAEB (SF/ TAEB) com (a) 1 bicamada ou (b) 3 bicamadas depositadas sobre eletrodos impressos de carbono 35
- Figura 3.** Representação esquemática dos filmes *LbL* de fibroína da seda e anticorpo TAEB (SF/ TAEB) em eletrodo com dois eletrodos de trabalho. Um dos eletrodos de trabalho contendo uma camada de SF e o outro 1 bicamada de SF/TAEB automontada 36
- Figura 4.** Eletrodos cobertos por 200µL solução eletrolítica (PBS pH 7.4)..... 37
- Figura 5.** Espectros de absorção por UV-vis do filme de fibroína da seda/ TAEB, contendo bicamadas. **Inserção:** Aumento da absorção a 280nm em função do número de camadas depositadas (SF/TAEB) 39
- Figura 6.** Espectros de fluorescência da fibroína da seda em solução aquosa (linha em preto) e do anticorpo monoclonal TAEB em solução (linha em azul), com excitação em 280nm 40
- Figura 7.** Espectros de fluorescência do filme automontado a cada camada de fibroína da seda (SF) e anticorpo (TAEB) até duas bicamadas, com excitação em 280nm 41
- Figura 8.** Voltamogramas cíclicos obtidos após incubação de soros negativos e positivos em eletrodo contendo somente fibroína da seda (SF) (a) e 1 bicamada de SF/TAEB (b) 43

Figura 9. Voltamogramas cíclicos obtidos após incubação de soro negativo e positivo em eletrodos produzidos com 3 bicamadas de fibroína da seda anticorpo TAEB	44
Figura 10. Voltamograma cíclico evidenciando a alteração de corrente após a fixação do anticorpo monoclonal sobre a fibroína da seda (seta azul). Inserção: ampliação da área indicada mostra o aumento da corrente no ciclo catódico após a fixação do MAb TAEB sobre a SF....	45
Figura 11. Curva analítica dos filmes automontados contendo 1 bicamada de fibroína/TAEB na presença de diferentes concentrações de antígeno E/S de <i>T. saginata</i> : 0,01µg/mL; 0,05µg/mL; 0,1µg/mL; 0,5µg/mL; 1,0µg/mL; 5,0µg/mL)	46
Figura 12. Voltamogramas cíclicos dos filmes <i>Layer-by-Layer</i> de SF/TAEB com 1 bicamada, na presença de soros-controle negativos (curva em vermelho), a: amostra negativa para cisticercose segundo a inspeção visual (curva em azul), e b: amostra positiva para cisticercose bovina (curva em verde). Inserção: região de detecção ampliada	47
Figura 13. Voltamogramas cíclicos obtidos em eletrodo com 1 bicamada de SF/TAEB de curva basal (PBS) e curva após incubação de amostra de soro bovino com cisticercose. Destaque para os pontos selecionados para normalização dos resultados	49

CAPÍTULO 3

Figura 1. Eletroforese SDS-PAGE a 12% de antígenos de excreção/secreção de <i>Taenia saginata</i> corado por azul de coomassie. (PM) = padrão de peso molecular (161-0374, BioRad®).....	66
Figura 2. Determinação de Classe e Subclasse de imunoglobulinas murinas por Citometria de Fluxo. Em A – controles positivos (IgG ₁ , IgG _{2b} , IgA, IgE), em B – controle negativo, em C – controles positivos	

(IgG_{2a}, IgG₃, IgM), em **D** – MAb TAES, identificado como IgG₁..... 67

Figura 3. Purificação do anticorpo monoclonal TAES1, classe/subclasse IgG₁ (AKTA Prime®)..... 68

Figura 4. *Western blotting* de antígeno E/S de *T. saginata*. Sobrenadante de cultura (SNC) do anticorpo monoclonal (MAb) TAES1 (1), MAb TAES1 purificado (2), SNC MAb TAES2 (3), SNC MAb TAES3 (4), SNC MAb TAES4 (5), soro de camundongo pós-imunização – controle positivo (6), soro de camundongo pré-imunização - controle negativo (7). (PM) = padrão de peso molecular (161-0374, BioRad®)..... 69

Lista de Abreviações

LISTA DE ABREVIACÕES

μA: microampère

μL: microlitro

Ac-ELISA: ELISA para detecção de anticorpos

Ag-ELISA: ELISA para detecção de antígenos

AUIN: Agência UNESP de Inovação

DP: desvio padrão

E/S: excreção/ secreção

ELISA: *Enzyme-linked immunosorbent assay*

HAT: hipoxantina-aminopterina-timidina

HGPRT: hipoxantina-guanina-fosforibosil-transferase

kDa: kilodalton

LbL: *Layer-by-Layer* / camada a camada

MAb: anticorpo monoclonal

MAPA: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

mL: mililitro

NEG: negativo

nm: nanômetros

PBS: tampão fosfato salina

POS: positivo

Q: quitosana

RIISPOA: Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal

SF: *Silk fibroin*/ fibroína da seda

SFB: soro fetal bovino

SIF: Serviço de Inspeção Federal

V: volts

Sumário

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	Página
INTRODUÇÃO.....	02
REVISÃO DE LITERATURA.....	04
1. Cisticercose bovina	04
2. Diagnóstico da cisticercose bovina	08
2.1 Inspeção da carne	08
2.2 Diagnóstico sorológico da cisticercose bovina.....	09
2.2.1 Detecção de anticorpos para cisticercose bovina.....	09
2.2.2 Detecção de antígenos para cisticercose bovina.....	12
3. Anticorpos monoclonais	15
4. Sensores eletroquímicos	19
5. Biossensores	20
6. Filmes automontados <i>Layer-by-Layer (LbL)</i>	24
7. Fibroína da seda	25
 CAPÍTULO 2 – Trabalho Científico “Imunossensor para o diagnóstico sorológico da cisticercose bovina”	 28
1. Introdução	30
2. Material e Métodos	32
3. Resultados e Discussão	38
4. Conclusões	50
 Resumo.....	 54
Abstract	55

CAPÍTULO 3 – “Produção de anticorpos monoclonais contra antígenos de excreção/secreção de metacestódeos de <i>Taenia saginata</i>”.	56
Introdução	58
Material e Métodos	59
Resultados e Discussão	62
Conclusões	63
Resumo	70
Abstract	71
 CAPÍTULO 4	
DISCUSSÃO GERAL	73
CONCLUSÕES GERAIS	77
BIBLIOGRAFIA	79
Anexos	89

Resumo

Resumo

A cisticercose bovina é uma zoonose cosmopolita e presente nos rebanhos bovinos de corte no Brasil, que ocorre em países em desenvolvimento, onde a infraestrutura sanitária inadequada e as más práticas na criação de gado permitem a contaminação de pastagem e água com fezes humanas contendo ovos do parasita. Os prejuízos financeiros decorrem da condenação ou tratamento (salga ou da congelação) das carcaças infectadas, dependendo da intensidade da infecção. O diagnóstico da cisticercose bovina é realizado durante o abate, pela inspeção das carcaças e realização de cortes em locais de predileção do parasita como a língua, masseter, coração e diafragma. Assim, a fim de promover o diagnóstico *ante-mortem* e permitir o tratamento adequado de animais infectados, muitos estudos foram realizados utilizando-se técnicas de detecção de anticorpos ou antígenos em amostras de soro bovino. O teste ELISA baseado em anticorpos monoclonais (MAbs) para a detecção de antígeno circulante (Ag-ELISA) tem sido estudado, mas apresenta baixa sensibilidade em animais com infecção leve, e permite a sua realização apenas em laboratórios bem equipados. O uso de biossensores em medicina tem crescido nos últimos anos, permitindo a detecção e quantificação de metabólitos, bem como o uso de diversos biopolímeros como matriz de imobilização como quitosana e fibroína da seda. Imunossensores são biossensores cuja resposta bioquímica relaciona-se à interação antígeno-anticorpo, que podem ser utilizados para detectar anticorpos ou antígenos, tendo sido utilizados no diagnóstico de enfermidades. Nesta pesquisa, desenvolveu-se o primeiro imunossensor para o diagnóstico da cisticercose bovina, com filmes produzidos camada por camada (LbL) contendo um MAb dirigido contra antígeno bruto de metacestódeos de *T. saginata* (TAEB) e fibroína de seda (SF), imobilizados, que mostrou-se promissor para aplicação futura no diagnóstico *ante-mortem* da cisticercose bovina.

Palavras-chave: Anticorpo monoclonal, cisticercose bovina, fibroína da seda, imunossensor, *Taenia saginata*

Abstract

Abstract

Bovine cysticercosis is a cosmopolitan zoonosis and very widespread in the Brazilian beef cattle. Cysticercosis usually occurs in developing countries, where poor sanitation and bad raising cattle practices allows the contamination of the pasture and water with human feces containing eggs. The financial losses are due to condemnation or treatment (salting or freezing) of infected carcasses, depending on the intensity of infection. Diagnosis of bovine cysticercosis is routinely done during slaughter by meat inspection of carcasses and incisions in predicted sites of muscles such as tongue, masseter, heart and diaphragm. Thus, in order to promote the *ante-mortem* diagnosis and allow appropriate treatment of infected animals, many studies have been performed using techniques to detect antibodies or antigens in bovine serum. ELISA using monoclonal antibodies (MAbs) for the detection of circulating antigen (Ag-ELISA) has been studied, but presents low sensitivity in animals with low parasite burden, and allows its realization only in well-equipped laboratories. The use of biosensors in medicine has grown in recent years, allowing detection and quantification of numerous metabolites, such as immobilization matrix having the most diverse biopolymers such as chitosan and silk fibroin. Immunosensors are biosensors which biochemical response is related to antigen-antibody interaction and can be used to detect antibodies or antigens, and has been tested for diseases diagnosis. In this research, we developed the first immunosensor for bovine cysticercosis diagnosis, produced with layer-by-layer (LbL) films containing a monoclonal antibody against crude *Taenia saginata* metacestode antigens (TAEB) and silk fibroin (SF) immobilized. Immunosensor showed to be a promising tool for further application in the *ante-mortem* bovine cysticercosis diagnosis.

Keywords: Monoclonal antibody, bovine cysticercosis, silk fibroin, immunosensor, *Taenia saginata*.

CAPÍTULO 1

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

A cisticercose bovina tem sido apontada como uma das principais causas de perdas econômicas por condenações de carcaças no Brasil (ALMEIDA, 2006; FERNANDES e BUZETTI, 2001). Trata-se de uma enfermidade de caráter zoonótico, distribuída mundialmente (ACHA e SZYFRES, 1986; MURREL, 2005), mas bastante relacionada a países em desenvolvimento, com deficiências de infraestrutura sanitária e veterinária (FLISSER, 1988; MURREL, 2005; OPAS, 1994).

Atualmente o diagnóstico da cisticercose bovina baseia-se na inspeção da carne após o abate do animal, com a realização de cortes em órgãos e locais da musculatura específicos. Como consequência da parasitose, as carcaças podem ser condenadas parcial ou totalmente, seguindo-se as recomendações contidas no Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal - RIISPOA (BRASIL, 1952). Sabe-se, entretanto, que a sensibilidade deste método é limitada, já que o parasita pode ser encontrado em outros locais da musculatura bovina (LOPES et al., 2011; MINOZZO et al., 2002; WANZALA et al., 2002) e devido à dificuldade em identificar carcaças com baixa taxa de infecção (DORNY et al., 2000; DRAELANTS et al., 1995; HARRISON et al., 1989; HAYUNGA et al., 1991). Dessa forma, carcaças contendo cisticercos podem chegar à população que, ao consumi-la de forma crua ou mal cozida, possibilita a manutenção do ciclo do parasita (LIGHTOWLERS et al., 1996; NEVES, 1998; OIE, 2014; WHO, 2014).

O método de diagnóstico ideal da cisticercose bovina alia a detecção de antígenos circulantes no soro animal, por melhor representar a correlação da presença de cisticercos viáveis (DRAELANTS et al., 1995; HARRISON et al., 1989) e sensibilidade suficiente para a identificação dos animais com baixa carga parasitária em infecções naturais.

A técnica de ELISA sanduíche para detecção de antígenos baseada no uso de anticorpos monoclonais vem sendo estudada e aprimorada durante décadas. Ainda que apresente sensibilidade de 2 a 10 vezes maior que a inspeção visual da carne (DORNY et al., 2000; ONYANGO-ABUJE et al., 1996b), muitos animais levemente infectados apresentam resultado falso negativo (BRANDT et al., 1992; DORNY et al., 2004; HARRISON et al., 1989; ONYANGO-ABUJE et al., 1996a, b; PAULAN et al., 2013; VAN KERCKHOVEN et al., 1998; WANZALA et al., 2007).

Desde o desenvolvimento dos sensores, o uso de biossensores na Medicina e Medicina Veterinária tem sido visto como promissor, devido à rapidez na obtenção dos resultados nas análises, baixo custo, facilidade de manipulação e portabilidade, possibilitando o transporte e uso a campo (ALFAYA e KUBOTA, 2002; LOWINSOHN e BERTOTTI, 2006; NORTH, 1985).

Dentre os diversos biopolímeros utilizados como matriz de imobilização de biomoléculas em biossensores, destacam-se a quitosana e a fibroína da seda (BARSAN et al., 2014; KRAJEWSKA, 2004; NOGUEIRA et al., 2010; MORAES et al., 2013). Os imunossensores, biossensores baseados na interação antígeno-anticorpo (NORTH, 1985; PEREIRA et al., 2002; RICARDI et al., 2002), têm sido bastante pesquisados nos últimos anos para o diagnóstico de enfermidades (MOINA e YBARRA, 2012).

A proposta deste trabalho foi desenvolver um protótipo de imunossensor baseado na imobilização de anticorpo monoclonal em fibroína da seda para o diagnóstico da cisticercose bovina de forma rápida, confiável, permitindo seu uso a campo com resultados obtidos em tempo real. Paralelamente, foi realizada a produção de anticorpos monoclonais contra antígenos de excreção/ secreção (E/S) de metacestódeos de *Taenia saginata*, visando a melhoria dos resultados no imunossensor e futura utilização em outros métodos de diagnóstico da cisticercose bovina.

REVISÃO DE LITERATURA

1. Cisticercose bovina

A cisticercose bovina é uma zoonose com distribuição mundial (ACHA e SZYFRES, 1986; MURREL, 2005), que ocorre principalmente em países da África, América Latina, Ásia e países do leste Mediterrâneo, e esporadicamente em países da América do Norte, Europa, Austrália e Nova Zelândia. Apesar da ocorrência global, a cisticercose bovina não faz parte da lista única de enfermidades de declaração obrigatória para animais terrestres e aquáticos da Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) do ano de 2014 (OIE, 2014).

A teníase por *Taenia saginata* é caracterizada pela presença da forma adulta do parasita no intestino delgado do ser humano, hospedeiro definitivo, cuja infecção se dá através da ingestão de carne bovina crua ou mal cozida contendo cisticercos viáveis (LIGHTOWLERS et al., 1996; NEVES, 1998; OIE, 2014; PAWLOWSKI, 1982; WHO, 2008; 2014). A larva da *T. saginata* se fixa na parede intestinal do humano onde se desenvolve até a fase adulta (PAWLOWSKI, 1982). As proglotes contendo ovos do parasita são eliminadas juntamente com as fezes humanas, cerca de 10-14 dias após infecção. Os ovos podem permanecer viáveis no ambiente por meses dependendo das condições climáticas, possibilitando a ingestão pelo bovino (NEVES, 1998; WHO, 2008, 2014).

O hospedeiro intermediário no ciclo da *T. saginata* é o bovino, e a presença da fase larval do parasita (metacestódeo) encistada na musculatura é denominada cisticercose (LIGHTOWLERS et al., 1996; OIE, 2014; WHO, 2008, 2014). O bovino infecta-se pela ingestão de água ou alimento contendo ovos ou proglotes do parasita. Os ovos sofrem ação das enzimas do abomaso, liberando as larvas infectantes (oncosferas) que avançam pela circulação sanguínea até chegarem a órgãos e tecidos, onde permanecem sob a forma de cistos (NEVES, 1998; WHO, 2008).

A ocorrência da cisticercose está associada a países em desenvolvimento, onde existam infraestrutura sanitária inadequada e más práticas de criação dos animais, permitindo o acesso dos bovinos às fezes humanas (FLISSER, 1988; MURREL, 2005; OPAS, 1994). Países desenvolvidos e áreas não endêmicas podem apresentar casos esporádicos de teníase humana e surtos de cisticercose bovina, apesar da melhor qualidade da saúde pública e infraestrutura veterinária, incluindo a inspeção regular das carcaças de bovinos para abate (MURREL, 2005). Outros fatores que estão relacionados à ocorrência da teníase e cisticercose são a popularidade de pratos feitos à base de carne bovina crua e o maior trânsito de pessoas pela migração e turismo desordenados (GEMMEL e JOHNSTONE, 1977; PAWLOWSKI, 1982; SCHANTZ et al., 1994).

No Brasil, as extensas áreas voltadas ao plantio da cana-de-açúcar podem influenciar na ocorrência dessa enfermidade devido à ausência de banheiros químicos ou à recusa dos trabalhadores rurais em utilizá-los. Dessa forma, trabalhadores eventualmente infectados podem ser responsáveis por disseminar os ovos do parasita no ambiente (RIBEIRO et al., 2012), já que em muitas vezes as duas atividades (plantio da cana e criação de gado de corte) são realizadas muito próximas ou na mesma propriedade, facilitando o transporte dos ovos pelas chuvas. A criação extensiva do gado de corte no país também tem um papel importante na manutenção da cisticercose, pois altos índices da doença estão relacionados à contaminação por ovos de tênia em regiões banhadas por rios e córregos (MARQUARDT et al., 2000), sendo a água um dos principais mecanismos responsáveis por disseminar os ovos no meio ambiente (ALLEPUZ et al., 2009), desde que haja pessoa infectada.

Em relação ao impacto para a saúde humana, em geral os portadores de teníase por *T. saginata* não apresentam complicações e convivem bem com a parasitose (SOUZA et al. 2007; UNGAR e GERMANO, 1992; WHO, 2014). Os sintomas mais relatados são desconforto abdominal, diarreia e perda de peso, além de prurido anal devido à migração das proglotes (DORNY e PRAET, 2007).

Economicamente a cisticercose bovina afeta a pecuária de corte devido às condenações parciais ou totais das carcaças parasitadas, sendo a principal responsável pela condenação de carcaças, o que limita as possibilidades de exportação de carnes e reduz o prestígio do país produtor e o valor de seus produtos (ALMEIDA, 2006; FERNANDES e BUZETTI, 2001). Os critérios para condenar parcial ou totalmente uma carcaça seguem as recomendações contidas no RIISPOA com relação aos achados *post mortem* (BRASIL, 1952).

A ocorrência da cisticercose no Brasil vem sendo observada ao longo dos anos, com taxas de prevalência que variam conforme a região e sistema de produção (FERNANDES e BUZETTI, 2001; MARIANO-DA-SILVA et al., 2012; MOREIRA DOS SANTOS, 1998; PEREIRA et al., 2006; SOUZA et al., 2007; UNGAR e GERMANO, 1992; ZAMPINI, 1994;). Recentemente, Dutra e colaboradores (2012) analisaram os dados obtidos de matadouros brasileiros inspecionados pelo Serviço de Inspeção Federal do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (SIF/MAPA) entre os anos de 2007 e 2010. A prevalência de cisticercose bovina observada no país foi de 1,05%, tendo o Estado de São Paulo apresentado a maior prevalência entre os estados (3,34%) (Figura 1). Os autores ressaltam que, no período de levantamento dos dados, não houve registro da enfermidade pelo órgão de fiscalização Federal em nove Estados, mas também não foram levantados os dados de inspeção Estadual ou Municipal (DUTRA et al., 2012).

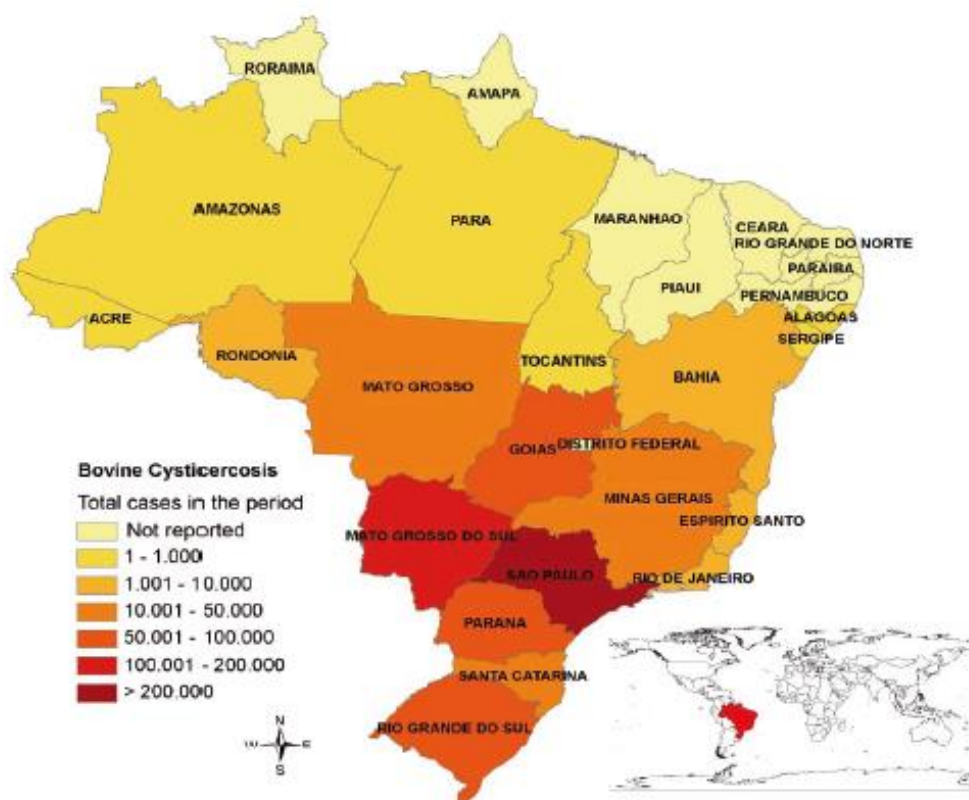


FIGURA 1. Mapa epidemiológico da prevalência da cisticercose bovina em animais abatidos nos estados brasileiros durante janeiro/ 2007 e abril/ 2010. Fonte: Dutra et al., 2012.

A pecuária de corte no Brasil tem crescido no que diz respeito à produção e à produtividade, como resultado da expansão agrícola no Centro-Oeste e Sudeste. Com isso, o Brasil alcançou destaque mundial como um dos maiores produtores e exportadores de carne bovina (PROCÓPIO et al., 2011). Em 2013, o rebanho bovino brasileiro alcançou o total de 212 milhões de cabeças (CONAB, 2014), das quais foram abatidas cerca de 34,4 milhões (IBGE, 2014). Dessa forma, levando-se em conta a prevalência da cisticercose bovina de 1% dos animais abatidos (DUTRA et al., 2012) os prejuízos econômicos atingem cerca de 344 mil bovinos. Este dado por si, diante da incerteza dos relatórios nacionais sobre a real prevalência da cisticercose bovina, pode dar a dimensão da perda econômica relacionada a essa zoonose. Entretanto, no Brasil, esses números podem estar subestimados devido à existência do consumo de carne bovina

proveniente de abatedouros clandestinos. Consequentemente, os animais abatidos não passam por fiscalização sanitária e os dados não são oficializados, o que eleva o risco de transmissão da teníase e manutenção do complexo teníase/cisticercose no país.

2. Diagnóstico da cisticercose bovina

2.1 Inspeção da carne

O diagnóstico da cisticercose bovina no Brasil está baseado na inspeção da carne durante o abate dos animais e segue as recomendações do Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal - RIISPOA quanto aos achados *post-mortem*, podendo implicar em condenações parciais ou totais das carcaças portadoras de cisticercose (BRASIL, 1952).

A inspeção da carne bovina para cisticercose consiste na realização de cortes e vistoria da musculatura bovina em locais de predileção do parasita, como língua, masseteres, coração e diafragma (BRASIL, 1952), porém já foi demonstrado que o parasita pode ser encontrado em outros locais da musculatura bovina (LOPES et al., 2011; MINOZZO et al., 2002; WANZALA et al., 2002) o que diminui a sensibilidade do método. Além disso, a inspeção visual da carne detecta a infecção após a morte do animal, quando não há mais a possibilidade de realizar nenhum tratamento (ONYANGO-ABUJE et al., 1996a) que evite os prejuízos econômicos e o risco de transmissão da parasitose.

É consenso entre pesquisadores do assunto que a inspeção visual da carne bovina durante o abate é insuficiente para eliminação da *T. saginata*, uma vez que apresenta um limiar de detecção limitado quando os animais são levemente infectados (DORNY et al. 2000; DRAELANTS et al., 1995; HARRISON et al., 1989; HAYUNGA et al., 1991). Acredita-se que a real prevalência da cisticercose bovina seja de 3 a 10 vezes maior que a estimada pela inspeção visual (DORNY et al. 2000; GEERTS et al. 1981; ONYANGO-ABUJE et al., 1996a).

O controle da cisticercose no rebanho de corte brasileiro é dificultado por características específicas como o sistema de criação, já que para a maioria as etapas de criação dos animais (cria, recria e engorda) são realizadas em propriedades diferentes, o que prejudica a identificação do foco de infecção (ROSSI et al., 2014). Outro ponto importante é o fato de que a maior parte dos animais infectados apresenta baixa carga parasitária e muitos passam despercebidos pela inspeção veterinária nos matadouros.

2.2 Diagnóstico sorológico da cisticercose bovina

2.2.1 Detecção de anticorpos para cisticercose bovina

Ao longo dos anos, vários esforços têm sido realizados na tentativa de desenvolver métodos capazes de diagnosticar, *ante mortem*, bovinos portadores de cisticercose. Testes sorológicos para detecção de anticorpos contra metacestódeos de *T. saginata* em bovinos têm sido descritos (ABUSEIR et al., 2007; FERRER et al., 2003; MINOZZO et al., 2004; MONTEIRO et al., 2006; OGUNREMI e BENJAMIN, 2010; PAULAN, et al., 2013; ONYANGO-ABUJE et al., 1996a, b), já que a infecção por *Taenia spp.* induz a produção de anticorpos (FERRER et al., 2003, 2007; FLISSER et al., 1979; HARRISON et al., 2005). Entretanto, a detecção dos anticorpos indica somente a exposição prévia do animal ao antígeno e não necessariamente infecção ativa, podendo resultar falso-positivo já que a imunoglobulina pode permanecer circulante mesmo após a eliminação do parasita (DORNY et al., 2003; HARRISON et al., 1989).

O principal método utilizado para diagnóstico sorológico da cisticercose bovina é o ensaio imunoenzimático – ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*), com o emprego de diferentes antígenos de *T. saginata* na fase sólida obtidos do fluido vesicular (ONYANGO-ABUJE et al., 1996a, b), antígenos totais (MINOZZO et al., 2004) ou antígenos de excreção-secreção (E/S) dos

metacestódeos (EICHENBERGER et al., 2013; OGUNREMI e BENJAMIN, 2010; PAULAN et al., 2013).

Com estudos mais aprofundados sobre antígenos imunodominantes da larva invasiva de *T. saginata* (oncosfera), diferentes peptídeos foram testados para o diagnóstico da cisticercose bovina. Dos seis peptídeos avaliados por Ferrer e colaboradores (2003) com soros de animais experimentalmente infectados, três mostraram-se promissores no uso como reagentes diagnósticos em teste ELISA: HP6-2, peptídeo derivado da molécula de adesão de superfície/secreção identificada pelo MAb HP6 (BENITEZ et al., 1996), Ts45S-10, peptídeo derivado de Ts45S – molécula de *T. saginata* homóloga à 45S de *T. ovis* (WATERKEYN et al., 1995) e o peptídeo TEG-1 derivado de TEG (R-Tso18), proteína de *T. saginata* homóloga à proteína de superfície de *Echinococcus spp.* (BENITEZ et al., 1998). Dois destes peptídeos (HP6-2 e Ts45S-10) foram testados em 2007 para avaliar a viabilidade do uso de “suco da carne” no diagnóstico da cisticercose bovina, visto que as amostras de sangue podem não estar disponíveis durante a inspeção da carne. O teste ELISA com melhor desempenho utilizou uma solução contendo os dois peptídeos resultando em sensibilidade de 100% e especificidade de 95% (ABUSEIR et al., 2007).

A técnica de ELISA também foi empregada com antígenos heterólogos de metacestódeos de *T. crassiceps* e *T. solium* para detecção de anticorpos contra a cisticercose bovina sem, no entanto, demonstrar correlação entre o número de cistos recuperados de bovinos infectados experimentalmente e os valores de absorbância (MINOZZO et al., 2004). Onyango-Abuje et al. (1996a) obtiveram resultados semelhantes utilizando antígeno de fluido vesicular de *T. saginata*, não conseguindo correlacionar a carga parasitária e o nível de anticorpos em animais natural e experimentalmente infectados. Essas observações reforçam as possíveis falhas ao utilizar a detecção de anticorpos para o diagnóstico da cisticercose.

Independente do tipo de antígeno utilizado é recorrente a dificuldade em se obter resultados satisfatórios ao testar animais com infecções leves

(MONTEIRO et al., 2006; PAULAN et al., 2013). Em geral, ao contrário do que ocorre nas infecções naturais, animais infectados artificialmente revelam maior intensidade da resposta imune na sorologia para cisticercose bovina, mesmo quando os animais recebem menor número de ovos por longo período (HAYUNGA et al., 1991; KYVSGAARD et al., 1990; SMITH et al., 1991). Monteiro et al. (2006) observaram maior número de resultados falso-negativos em animais com infecção natural quando comparados a animais com infecção experimental, utilizando antígenos heterólogos de *T. crassiceps* e *T. solium* em ELISA para detecção de anticorpos (Ac-ELISA).

Curiosamente, Ogunremi e Benjamin (2010), obtiveram altos valores de sensibilidade (92,9%) ao testar soros de bovinos com infecção experimental, mas com baixa carga parasitária (1 a 87 cistos), utilizando Ac-ELISA e antígeno de E/S de *T. saginata*. Estes resultados favoráveis podem ser explicados pelo uso do soro de animais experimentalmente infectados aliado à detecção específica da imunoglobulina G (IgG₁) nos soros dos animais.

No Brasil, a detecção de anticorpos em animais com baixa carga parasitária por infecção natural apresentou maior sensibilidade quando utilizado antígeno de fluido vesicular de *T. solium* na fase sólida do Ac-ELISA (64%) quando comparada aos antígenos E/S (52%) e fluido vesicular de *T. saginata* (49%) (PAULAN et al., 2013).

Visto que a detecção de anticorpos indica somente a exposição prévia do animal ao antígeno e não necessariamente infecção ativa (DORNY et al., 2003; HARRISON et al., 1989) sua utilização fica restrita, apesar de apresentar-se como valiosa ferramenta epidemiológica para estudos em áreas endêmicas na detecção de rebanhos reagentes (DORNY et al., 2000, 2002; GEERTS et al., 1981; HARRISON et al., 1989; ONYANGO-ABUJE et al., 1996b; PAULAN et al., 2013). Entretanto, não atendem à principal necessidade: detectar a presença de parasitas vivos ou seus produtos de secreção (HARRISON et al., 1989).

2.2.2 Detecção de antígenos para cisticercose bovina

Testes diagnósticos baseados na detecção de antígenos têm sido desenvolvidos devido à melhor correlação com a presença de cisticercos viáveis e, portanto, infectantes (DRAELANTS et al., 1995; HARRISON et al., 1989). Em especial, o teste ELISA sanduíche para detecção de antígenos circulantes (Ag-ELISA) baseado no uso de anticorpo monoclonal tem sido bastante pesquisado, na busca por um diagnóstico sensível e específico da cisticercose bovina. Estima-se que a detecção de antígenos circulantes por Ag-ELISA seja 2 a 10 vezes mais sensível que a inspeção visual de rotina (DORNY et al., 2000; ONYANGO-ABUJE et al., 1996b).

Os primeiros MAbs para diagnóstico de antígenos circulantes foram produzidos e selecionados contra antígenos de superfície e/ou de excreção/secreção de metacestódeos de *T. saginata* (BRANDT et al., 1992; HARRISON et al., 1989). Ambos os ensaios de Ag-ELISA apresentaram resultados semelhantes, especialmente em relação à baixa sensibilidade para detectar animais levemente infectados. O limiar de detecção foi de 200 cistos no estudo de Harrison et al. (1989) e de 88 cistos vivos no estudo de Brandt et al. (1992). Ambos os testes também demonstraram que a detecção dos produtos de secreção/excreção dos metacestódeos está associada à infecção ativa, visto que animais experimentalmente infectados, inicialmente detectados pelo Ag-ELISA, deixaram de ser reagentes após o tratamento dos animais com praziquantel, para eliminação dos cisticercos. Já a detecção de anticorpos no soro desses animais manteve-se nos dois momentos e em ambos os experimentos (BRANDT et al., 1992; HARRISON et al., 1989).

Foi demonstrado que os Ag-ELISA utilizando os anticorpos monoclonais HP10 (HARRISON et al., 1989) e 2H8/ 12G5 (BRANDT et al., 1992) são específicos para *T. saginata*, apresentando baixa reação cruzada com outros parasitas comuns em bovinos. Entretanto, a forte reação cruzada com *Taenia solium* possibilita o uso de ambos no diagnóstico das cisticercoses suína e humana (HARRISON et al., 1989; BRANDT et al., 1992).

O sistema Ag-ELISA/ HP10 (HARRISON et al., 1989) foi utilizado posteriormente na investigação de antígenos circulantes em amostras de soro de bovinos natural e experimentalmente infectados. Os resultados correlacionaram-se positivamente com o número de cisticercos vivos dos animais com infecção experimental, sendo possível detectar bovinos albergando 14 ou mais cisticercos. Entretanto, o mesmo não ocorreu para os animais naturalmente infectados e a sensibilidade do teste foi de 22% (5/ 23) para animais portadores de 1 a 29 cistos vivos (ONYANGO-ABUJE et al; 1996a). A detecção por Ag-ELISA foi mais sensível que a inspeção de rotina, já que identificou quase o triplo de animais (ONYANGO-ABUJE et al., 1996a, b).

Wanzala et al (2007) avaliaram a confiabilidade do Ag-ELISA/ HP10 no diagnóstico da cisticercose bovina em bovinos do Quênia (HARRISON et al., 1989) e obtiveram valores de sensibilidade e especificidade de 60% e 100%, respectivamente, em animais artificialmente infectados, enquanto que, para animais com infecção natural os valores foram de 80% (sensibilidade) e 60% (especificidade) (WANZALA et al., 2007). Entretanto, esses valores não foram igualmente observados na avaliação de bovinos naturalmente infectados no Brasil, os quais se infectam gradualmente com menor número de ovos do parasita, quando comparados aos experimentalmente infectados, que recebem maior número de ovos de uma só vez. Os valores de sensibilidade variaram de 11% a 83% e os de especificidade de 83% – 94%, dependendo do ponto de corte selecionado (PAULAN et al., 2013).

O ensaio imunoenzimático Ag-ELISA/HP10 também foi aplicado para avaliar o desempenho da vacinação de bovinos com diferentes antígenos. A técnica demonstrou ser rápida e capaz de controlar sorologicamente os animais, além de confirmar a eficácia da vacina testada, por indicar a presença de cisticercos viáveis em animais desafiados via oral (HARRISON et al., 2005).

A sensibilidade do teste Ag-ELISA foi melhorada pela substituição dos MAbs da classe IgM (BRANDT et al., 1992) por MAbs da classe IgG, além do sucesso na dissociação de imunocomplexos com o tratamento dos soros pelo

calor (VAN KERCKHOVEN et al., 1998). O desempenho do Ag-ELISA com os dois MAbs da classe IgG (158C11 e 60H8) foi comparado ao Ag-ELISA descrito por Brandt et al (1992), resultando em aumento de sensibilidade de 56 para 92% em animais abrigando acima de 50 cisticercos, e de 4,2% para 12,7% nos animais menos parasitados (< 50 cistos) (VAN KERCKHOVEN et al., 1998).

A metodologia Ag-ELISA modificada por Van Kerckhoven et al. (1998) foi posteriormente utilizada em estudos soro-epidemiológicos na Bélgica e Zâmbia (DORNY et al., 2000, 2002). Carcaças de 20 abatedouros da Bélgica foram avaliadas pela inspeção visual e as amostras de soro correspondentes foram testadas por Ag-ELISA, resultando em 0,26% de bovinos com cisticercose (3/1164) na inspeção e 3,09% (36/1164) de positividade na detecção de antígeno circulante. Entretanto, os três animais identificados na inspeção não foram detectados pelo Ag-ELISA, muito provavelmente devido à baixa sensibilidade do teste (12,8%) em animais com baixa carga parasitária (VAN KERCKHOVEN et al., 1998; DORNY et al., 2000). Na Zâmbia, a prevalência observada na detecção de antígeno circulante foi de 6,1% (38/ 628), muitas vezes maior que os dados de prevalência oficiais (0,02%) (DORNY et al., 2002).

Estudo sorológico transversal realizado em diferentes abatedouros do nordeste da Espanha revelou soroprevalência de 1,1% por Ag-ELISA (BRANDT et al., 1992 modificado por DORNY et al., 2004), valor cerca de 50 vezes maior que a obtida na inspeção dos bovinos (0,02%) no mesmo período (19/ 90.891). A prevalência variou de 0 a 12,5% nos diferentes abatedouros e, de todos os animais reagentes no Ag-ELISA (23/2073), nenhum foi detectado pela inspeção visual (ALLEPUZ et al., 2012).

O primeiro dot-ELISA para detecção de antígenos circulantes em bovinos com cisticercose, foi descrito utilizando o MAb 12G5 (BRANDT et al., 1992) e soro de 40 bovinos experimentalmente infectados. O teste foi realizado pareado ao Ag-ELISA descrito por Brandt et al. (1992) e os resultados apresentaram-se muito semelhantes: dos 11 animais com carga parasitária <100 cistos, somente 4 (dot-ELISA) e 2 (Ag-ELISA) foram detectados, enquanto que, nos animais

portadores de 100 ou mais cistos, foram identificados 21/24 (dot-ELISA) e 20/24 (Ag-ELISA) (DRAELANTS et al., 1995). Entretanto, não foram testadas amostras de bovinos naturalmente infectados, o que dificulta a validação do teste quanto à sua utilização a campo, já que a maioria dos bovinos infectados apresenta baixa carga parasitária.

3. Anticorpos Monoclonais

Anticorpos monoclonais ou MAbs (do inglês *monoclonal antibodies*) são ferramentas importantes capazes de identificar a presença de um epítipo de interesse, já que possuem especificidade de ligação ao antígeno, homogeneidade e permitem sua produção em quantidades ilimitadas (HARLOW e LANE, 1988).

Os responsáveis pela descoberta da tecnologia de produção dos anticorpos monoclonais foram Köhler e Milstein (1975), através da obtenção de células híbridas produtoras de anticorpos específicos (hibridomas). A fusão de uma célula secretora de anticorpo (linfócito B) e uma célula tumoral (mieloma) gera essas células híbridas, as quais podem ser mantidas em crescimento *in vitro* e mantêm a capacidade de produção do anticorpo específico (HARLOW e LANE, 1988) (Figura 2).

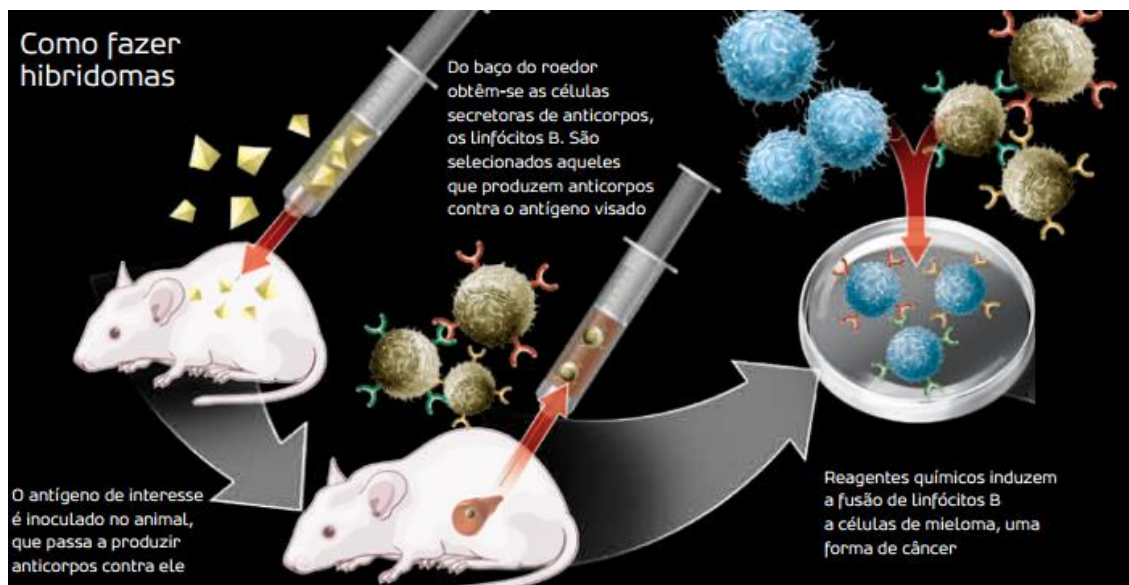


FIGURA 2. Produção de hibridoma para obtenção de anticorpos monoclonais. Adaptado de Revista UNESP Ciência, abril/2011 (CHRISTANTE, 2011).

As linhagens de mieloma murino têm sido bastante utilizadas na produção de MAb, pois aliam características como a perda da capacidade de secreção, crescimento em cultura de suspensão, que permite sua produção em grande escala e a adaptação a diferentes condições de cultura (ROSA et al., 2012).

Uma etapa importante na produção de MAb é a seleção dos hibridomas, pois após o procedimento de fusão celular muitas células se mantêm não fusionadas. Os linfócitos B não fusionados não prejudicam a cultura, pois são incapazes de crescer em cultura celular, diferentemente dos mielomas. Portanto, as linhagens de mieloma mais comumente utilizadas possuem uma mutação no gene responsável por uma das enzimas da via de salvamento da síntese de purinas como a hipoxantina-guanina-fosforibosiltransferase (HGPRT). Dessa forma, a suplementação do meio de cultura com algum componente que realize o bloqueio da via *de novo* da síntese de purinas obriga a célula a utilizar a via de salvamento. As células cuja enzima não é funcional não sobrevivem em cultura celular nessas condições, ao contrário das células híbridas (HARLOW e LANE, 1988) (Figura 3).

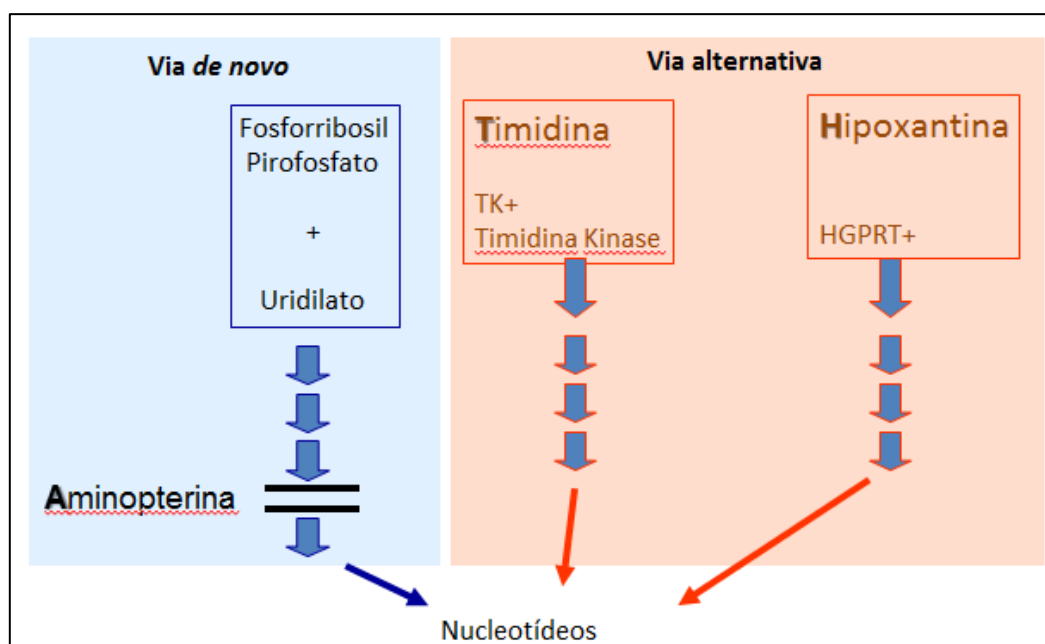


FIGURA 3. Seleção enzimática de hibridomas utilizando suplemento HAT, pela via de síntese de nucleotídeos.

Embora existam diferentes estratégias para aperfeiçoar a produção dos MAb, como quimerização, humanização e outras formas de produção de MAb recombinantes (HUDSON e SOURIAU, 2003) as linhagens de mieloma murino continuam a ser amplamente utilizadas. As fases necessárias para obtenção dos MAb são: imunização dos camundongos, fusão celular, triagem ou *screening*, clonagem, amplificação e purificação dos anticorpos. O procedimento de clonagem é indispensável na produção dos anticorpos monoclonais, pois garante que a imunoglobulina obtida ao final seja oriunda de células idênticas. Todas as etapas necessárias para a obtenção de anticorpos monoclonais murinos estão representadas a seguir (Figura 4).

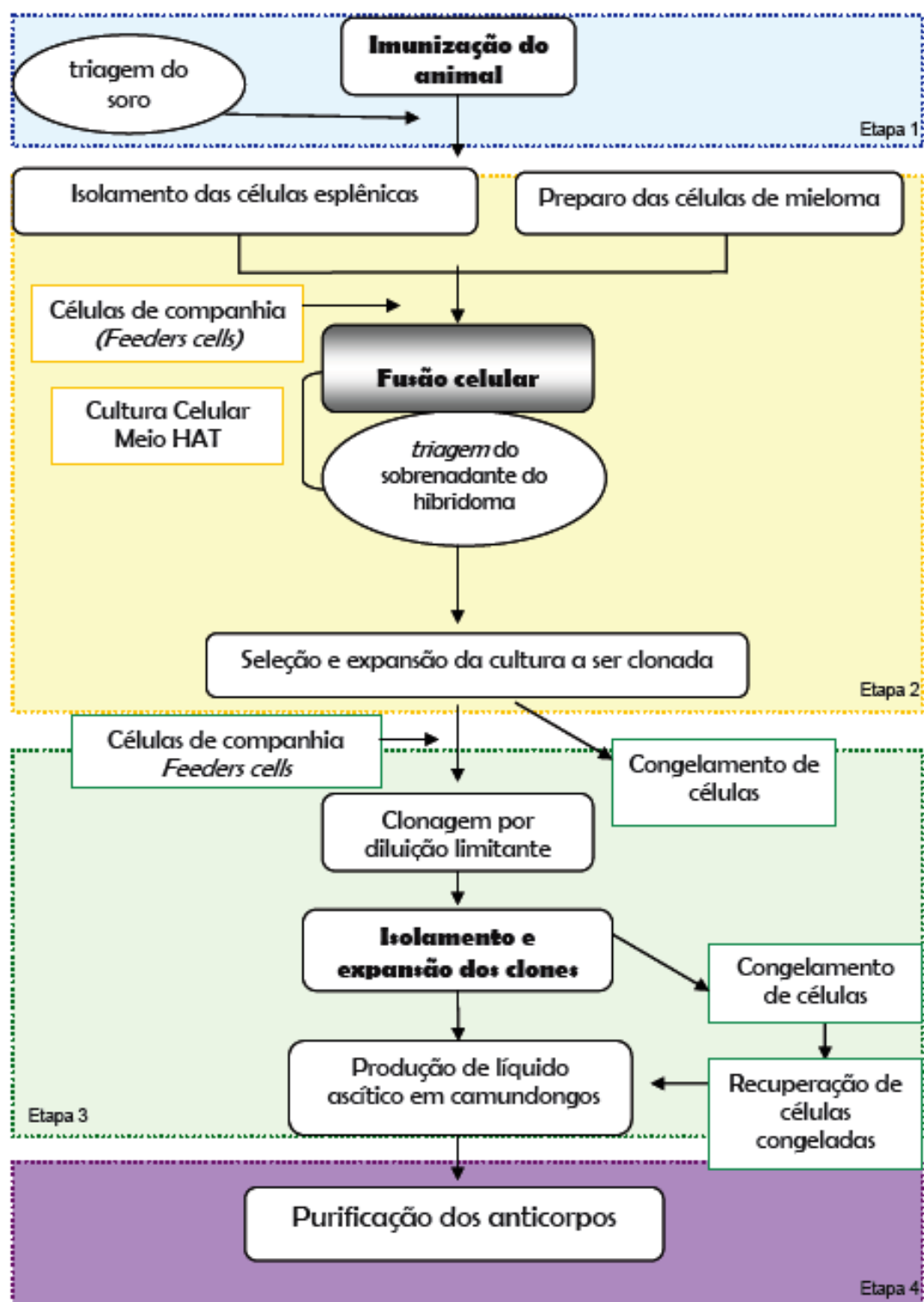


FIGURA 4. Etapas principais para produção de anticorpos monoclonais.

4. Sensores eletroquímicos

A eletroquímica estuda os sistemas capazes de gerar corrente elétrica a partir de reações de oxirredução ou sistemas nos quais a oxirredução ocorre pela a passagem de uma corrente elétrica (eletrólise). Um sistema eletroquímico é composto por, no mínimo, dois eletrodos (condutores eletrônicos) separados por um condutor eletrolítico (TICIANELLI e GONZALEZ, 2005).

Muitos procedimentos analíticos necessitam de uma instrumentação complexa e pessoal altamente especializado (ALFAYA e KUBOTA, 2002), no entanto, a busca por ensaios rápidos e de fácil aplicação tem sido cada vez maior. Sensores químicos são dispositivos com características que satisfazem essa necessidade e têm sido elementos essenciais na instrumentação analítica, podendo dispensar a utilização de aparelhos complexos e uma grande infraestrutura (ALFAYA e KUBOTA, 2002).

Com a crescente necessidade de testes analíticos simples, rápidos e baratos para a determinação de compostos químicos e biológicos em baixas concentrações, houve um crescimento no desenvolvimento de sensores eletroquímicos, como os potenciométricos, amperométricos e voltamétricos (ALEGRET, 1996; ALFAYA e KUBOTA, 2002).

As principais vantagens do uso de sensores eletroquímicos referem-se à portabilidade, facilidade de automação, possibilidade de miniaturização e baixo custo. As medidas são obtidas *in situ* e em tempo real e, mesmo não sendo precisas e exatas como às obtidas por outros métodos instrumentais, muitas vezes são suficientes para tomada de decisão (LOWINSOHN e BERTOTTI, 2006). O desenvolvimento dos eletrodos impressos (*screen-printed*) possibilitou a miniaturização dos eletrodos, aliando ao sistema a redução dos custos, facilidade de manipulação e necessidade de baixo volume de amostra para análise (PUMERA et al., 2007) (Figura 5).

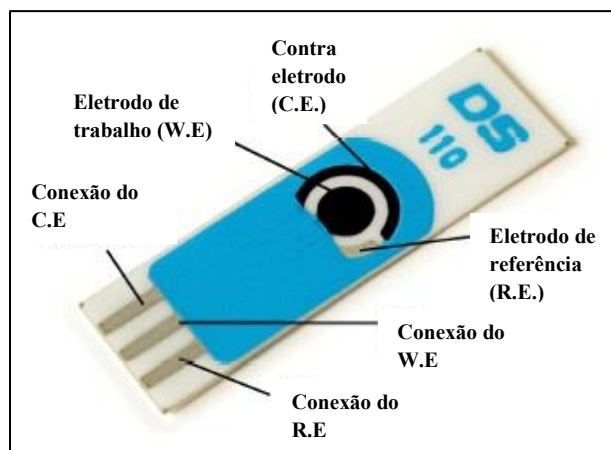


FIGURA 5. Ilustração dos componentes de um eletrodo impresso de carbono, com um eletrodo de trabalho (ref. 110, DropSens[®]).

Com os avanços no campo da medicina e a necessidade de identificar e quantificar metabólitos de forma rápida, específicas e em amostras biológicas com volumes muito pequenos, houve o desenvolvimento dos biossensores (ALFAYA e KUBOTA, 2002).

5. Biossensores

Os Biossensores são sensores químicos constituídos por um componente biológico ativo como reconhecedor conectado a um transdutor (dispositivo capaz de converter um tipo de sinal em outro) (Figura 6). O componente biológico faz o reconhecimento de determinada substância através de reação bioquímica específica, e o transdutor transforma o sinal biológico resultante do processo bioquímico em um sinal analítico mensurável (variação de corrente, potencial, temperatura etc). São considerados dispositivos com alta seletividade em relação a determinado analito (BYRNE et al., 2009; FATIBELLO-FILHO e CAPELATO, 1992; LOWINSOHN e BERTOTTI, 2006; MEDEIROS et al., 2012).

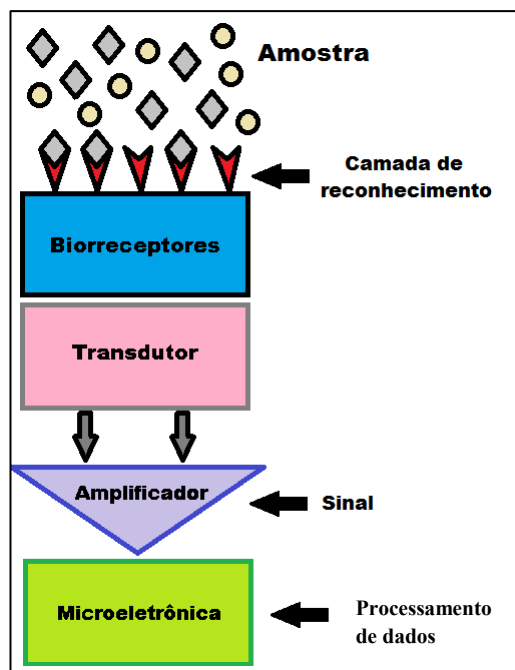


FIGURA 6. Representação esquemática de um biossensor (LIMA, 2014)

Os biossensores podem ser classificados de acordo com o transdutor utilizado em: eletroquímicos (potenciométricos, amperométricos, condutimétricos), ópticos, térmicos, piezoelétricos (detector de massa), entre outros (FATIBELLO-FILHO e CAPELATO, 1992; LOWINSOHN e BERTOTTI, 2006). O componente biológico ativo (reconhecedor) pode ser uma célula, enzima, antígeno, anticorpo, ácidos nucleicos, dentre outros (ALFAYA e KUBOTA, 2002; FATIBELLO-FILHO e CAPELATO, 1992; MOINA e YBARRA, 2012).

A possibilidade de imobilizar um material biológico no sensor é interessante por permitir a redução do custo por análise, aumentar a rapidez e exatidão do processo, já que não há a necessidade de sua retirada do meio de reação para posterior aplicação (FATIBELLO-FILHO e CAPELATO, 1992). Quando o material biológico imobilizado é um antígeno ou anticorpo, ou seja, a resposta bioquímica está ligada à interação antígeno-anticorpo, o biossensor é denominado imunossensor (NORTH, 1985; PEREIRA et al., 2002; RICARDI et al., 2002).

Imunossensores podem ser construídos para a detecção de antígenos ou de anticorpos, mas prefere-se a detecção de anticorpos, pois a imobilização da imunoglobulina sobre uma superfície pode ter como consequência a perda de afinidade (MOINA e YBARRA, 2012). É importante ressaltar que as sensibilidades dos ensaios dependem tanto das propriedades do transdutor quanto da qualidade do anticorpo empregado (BYRNE et al., 2009).

Imunossensores baseados nos diferentes tipos de transdutores têm sido utilizados para a determinação de bactérias, fungos, vírus patogênicos e toxinas. Os sistemas de captura são frequentemente utilizados envolvendo a imobilização do anticorpo e a subsequente captura do agente e, quando necessário, a adição de um anticorpo secundário para aumentar a sensibilidade (BYRNE et al., 2009). Em decorrência da elevada estabilidade do complexo antígeno-anticorpo, uma vez que ele se forma, não permite a reutilização do imunossensor, o que faz com que a maioria seja de uso único (MOINA e YBARRA, 2012).

Houve um aumento expressivo de publicações nos últimos anos sobre imunossensores, segundo levantamento realizado em 2012 (Figura 7), com destaque para os imunossensores eletroquímicos, possivelmente devido à facilidade de sua integração com a instrumentação eletrônica (MOINA e YBARRA, 2012).

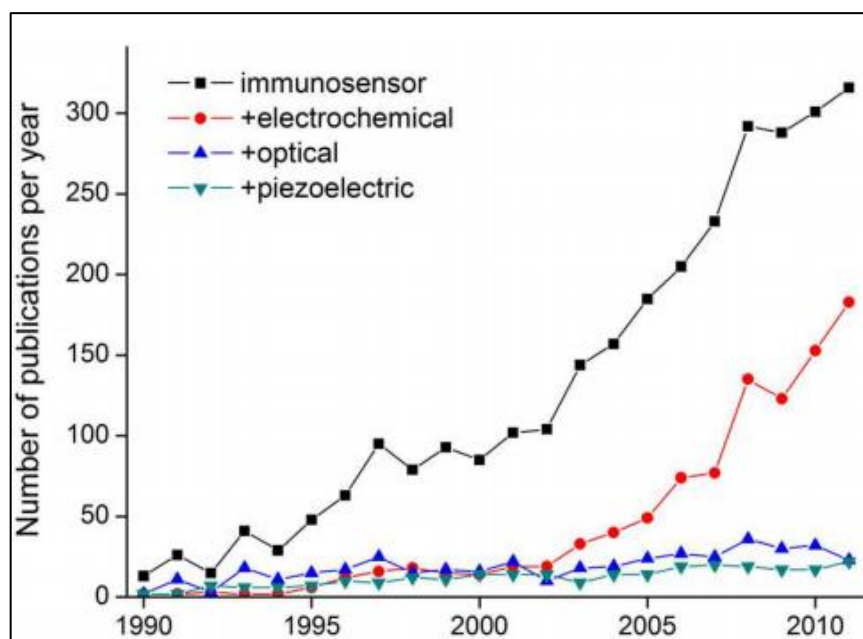


FIGURA 7. Evolução do número de artigos publicados sobre imunossensores de 1990 a 2011 na plataforma *Scopus* (Fonte: MOINA e YBARRA, 2012).

O futuro quanto à utilização dos imunossensores é considerado promissor, especialmente na área diagnóstica, devido à alta especificidade e baixos limiares de detecção (FATIBELLO-FILHO e CAPELATO, 1992; ZHAO et al., 2006), aliados ao fato de serem compactos, permitindo o uso de amostras em microlitros e sua utilização em áreas subdesenvolvidas ou isoladas, onde a realização de imunoensaios como o ELISA não são possíveis. Os biossensores ainda podem contar com as melhorias proporcionadas com o uso de nanomateriais e nanoestruturas (MOINA e YBARRA, 2012). Acredita-se que a Medicina Veterinária também possa se beneficiar com essa tecnologia permitindo a realização do diagnóstico das enfermidades animais a campo, de forma rápida, confiável e sensível.

6. Filmes automontados *Layer-by-Layer (LbL)*

O método de produção de filmes automontados camada por camada (*Layer-by-Layer*) foi primeiramente proposto por Decher e colaboradores (1992). Baseado no emprego de materiais com cargas opostas para a produção dos filmes, o método permitiu adsorver espécies aniônicas e catiônicas sobre substratos sólidos (DECHER et al., 1992; LVOV et al., 1993). Para que ocorra adsorção por atração eletrostática, o substrato deve apresentar carga oposta à da primeira solução utilizada, assim como a segunda solução precisa ter carga oposta à primeira. Os procedimentos de lavagens são realizados para retirar o excesso de material e a repetição deste processo promove a formação de filmes ultrafinos com multicamadas (PATERNO et al., 2001) (Figura 8).

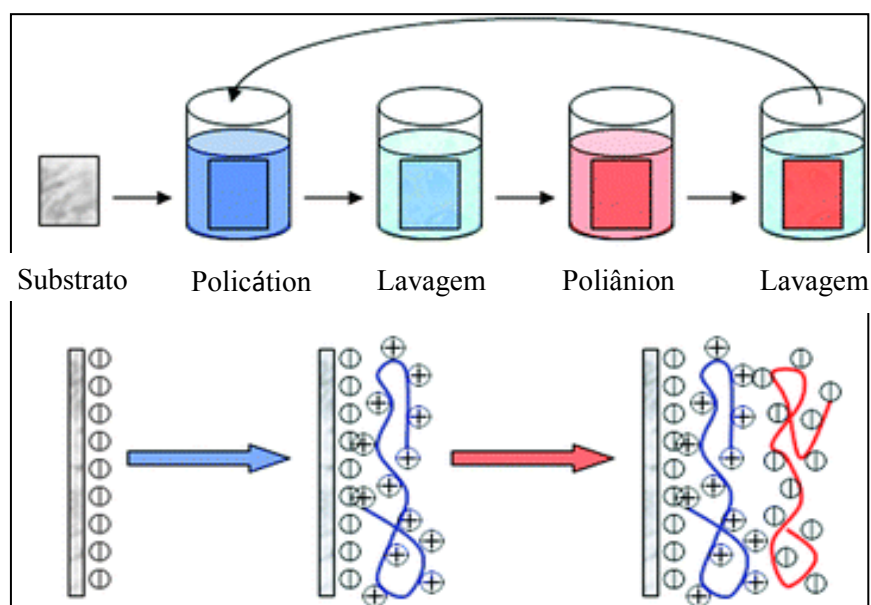


FIGURA 8. Representação esquemática da formação de filmes automontados *Layer-by-Layer (LbL)* por adsorção sequencial de polieletrólitos com cargas opostas. Adaptado de Xiang et al., 2012.

O método *LbL* tem sido amplamente utilizado na produção de filmes nanoestruturados devido às suas principais vantagens como facilidade na

construção, baixo custo e sem a necessidade de materiais elaborados (DECHER et al., 1992; LVOV et al., 1993; ZHAO et al., 2006).

O emprego da técnica *LbL* em imunossensores se destaca pela grande quantidade de materiais que pode ser utilizada (CRESPILHO et al., 2006) e por serem construídos com substâncias solúveis em água, favorecendo o emprego de biomoléculas. Também possibilita a adequação das condições, como pH e temperatura, para preservar as biomoléculas, minimizando sua desnaturação (ARIGA et al., 2006; CRESPILO et al., 2006).

Diversos biopolímeros naturais tem sido utilizados como matriz para imobilização de biomoléculas, possibilitando a produção de biossensores mais estáveis, sensíveis e seletivos, como quitina (KRAJEWSKA, 2004), quitosana (BARSAN et al., 2014; KRAJEWSKA, 2004; NOGUEIRA et al., 2010) e fibroína da seda (MORAES et al., 2013; NOGUEIRA et al., 2010).

7. Fibroína da seda

A seda produzida pelo *Bombyx mori*, popularmente conhecido como bicho-da-seda, é composta por dois tipos de proteínas: a sericina e a fibroína. A fibroína localiza-se no centro da seda e é envolta por camadas de sericina (ALTMAN et al., 2003) (Figura 9). A fibroína da seda é formada por polipeptídeos de cadeia leve (25kDa) e pesada (350kDa), com domínios de folhas- β e caráter aniônico (ZHOU et al., 2000), ou seja, devido às cargas negativas em sua cadeia, atrai e se liga a moléculas com cargas positivas.

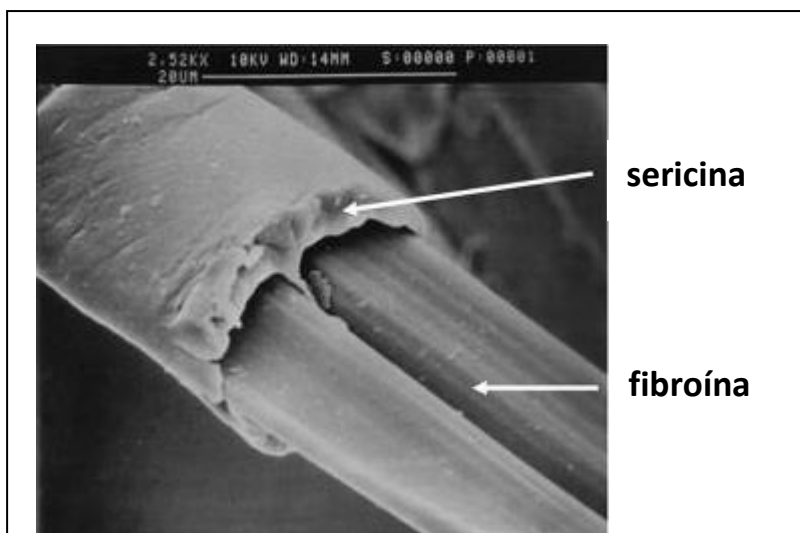


FIGURA 9. Micrografia eletrônica de varredura da estrutura da seda, destacando a fibroína revestida pela sericina. Créditos: Dr. A Motta, Universidade de Trento, Itália. Fonte: SANTIN e PHILLIPS, 2012.

Os aminoácidos que compõem a fibroína da seda são principalmente glicina, alanina e serina, apresentando em menor quantidade tirosina e triptofano além de outros aminoácidos residuais. As repetições de glicina e alanina formam o arranjo de folhas- β assimétricas (região cristalina), de forma que um lado é ocupado por hidrogênios de glicina e o outro por grupos metila das alaninas. As propriedades mecânicas dependem dessa estrutura cristalina, que é predominantemente hidrofóbica (Figura 10). Já a região amorfa é hidrofílica e capaz de reter a umidade, sendo formada pela maior parte dos aminoácidos com uma cadeia lateral volumosa e polar (CHENG et al., 2014; VEPARI e KAPLAN, 2007; ZHOU et al., 2000).

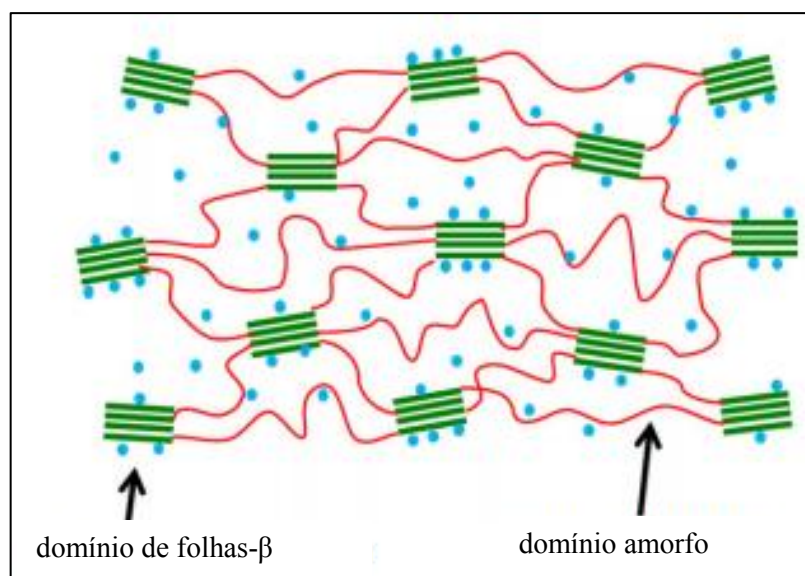


FIGURA 10. Ilustração dos domínios de folhas- β incorporados na matriz amorfa. Os pontos azuis representam moléculas de água. Adaptado de Cheng et al., 2014.

A fibroína da seda é um biopolímero amplamente estudado e utilizado para aplicações em biomateriais. Apresenta excelentes propriedades mecânicas, estruturais e de biocompatibilidade, motivos que explicam seu emprego em estudos *in vitro* e *in vivo* (ALTMAN et al., 2003; SANTIN et al., 1999; YUCEL et al., 2014). O uso dessa proteína é amplo e compreende a fabricação de hidrogéis, fibras, esponjas, microesferas e filmes finos, com sua aplicação como suporte (*scaffold*) para engenharia de tecidos e modelos *in vitro*, *drug delivery* e imobilização de biomoléculas em sensores (ALTMAN et al., 2003; MORAES et al., 2013; ROCKWOOD et al., 2011; YUCEL et al., 2014).

CAPÍTULO 2

CAPÍTULO 2 - Trabalho Científico a ser enviado para publicação à Revista *Experimental Parasitology*

“Imunossensor para o diagnóstico sorológico da cisticercose bovina”

“Immunosensor for the serological diagnosis of bovine cysticercosis”

Josy C. Vicentini-Oliveira^a, Silvana de Cássia Paulan^e, Marli L. Moraes^b, Sidney J. L. Ribeiro^c, Lais R. Lima^c, Elenice Deffune^d, Cáriss M. Nunes^e, Germano F. Biondi^{a*}

^a UNESP – Univ Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública, Distrito de Rubião Junior, Botucatu, SP, 18618-970, Brazil

^b UNIFESP – Univ Federal de São Paulo, Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos, SP, Brazil

^c UNESP – Univ Estadual Paulista, Instituto de Química, Araraquara, SP, Brazil

^d UNESP – Univ Estadual Paulista, Hemocentro de Botucatu, Botucatu, SP, Brazil

^e UNESP – Univ Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária, Araçatuba, SP, Brazil

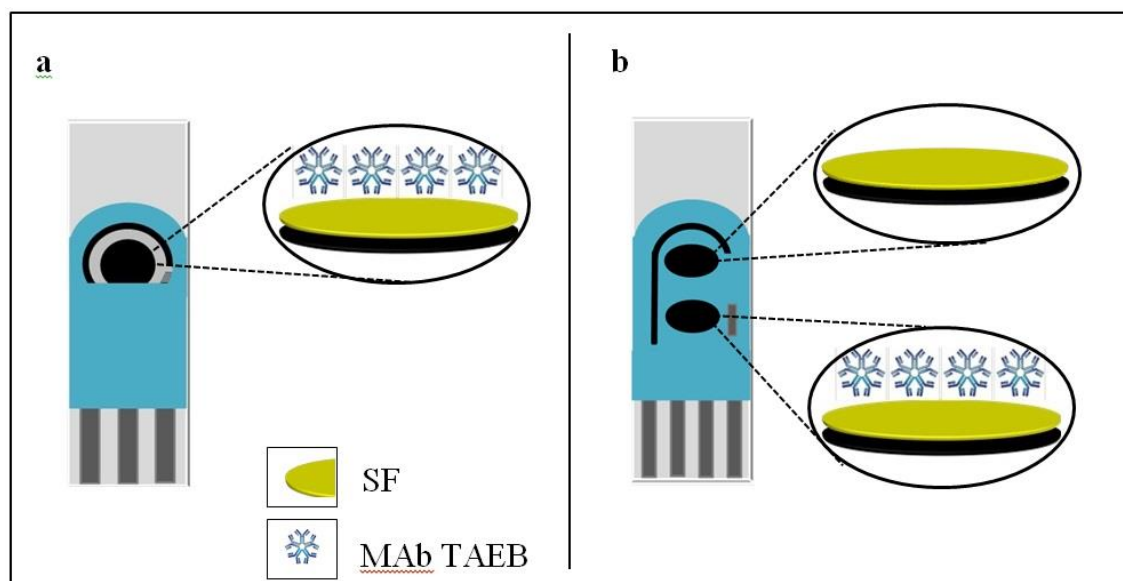
* Corresponding author.

Email address: gfbion@gmail.com, germano@fmvz.unesp.br

Highlights

1. we develop an immunosensor based on the immobilization of silk fibroin and a monoclonal antibody against *Taenia saginata* antigen
2. test showed 100% of specificity and 58.3% of sensitivity
3. the tool was able to detect circulating antigens in low parasitic burden cows.

Graphical Abstract



1. Introdução

A cisticercose bovina é uma doença cosmopolita caracterizada pela presença de formas metacestóides da *Taenia saginata* na musculatura dos bovinos, hospedeiros intermediários no ciclo deste parasita (Lightowlers et al., 1996; Hoberg, 2002).

A ocorrência da cisticercose está associada a países em desenvolvimento, como o Brasil, que apresentam falta de infraestrutura sanitária adequada e más práticas de criação dos animais, permitindo a contaminação das pastagens e aguadas com fezes humanas (Neves, 1998; WHO, 2014). O controle da cisticercose no rebanho de corte brasileiro é ainda mais difícil devido ao comércio e consumo de carne bovina proveniente de abates clandestinos (sem inspeção sanitária das carcaças).

A prevalência da cisticercose bovina no Brasil varia conforme a região, sendo de 0,01% a 3,34% (Dutra et al., 2012). Entretanto, como a detecção da cisticercose bovina em animais com baixa carga parasitária é limitada (Harrison et al., 1989; Draelants et al., 1995; Dorny et al., 2000), acredita-se que a

prevalência real seja de 3 a 10 vezes maior que a estimada pela inspeção visual (Onyango-Abuje et al., 1996a; Dorny et al., 2000).

O diagnóstico da cisticercose bovina é rotineiramente feito após o abate dos animais, no momento da inspeção das carcaças, e consiste na observação e realização de cortes da musculatura e órgãos determinados (língua, masseteres, coração e diafragma). Assim, os prejuízos financeiros acarretados com esta enfermidade devem-se às condenações parciais (tratamento por salga ou congelamento) ou totais das carcaças infectadas, dependendo do grau de infecção (Brasil, 1952; Fernandes & Buzetti, 2001; Almeida et al., 2006).

A detecção de anticorpos para a cisticercose bovina apresenta-se como valiosa ferramenta para estudos epidemiológicos (Harrison et al., 1989; Onyango-Abuje et al., 1996b; Dorny et al., 2000, 2002), mas não atende à principal necessidade que é identificar a presença de parasitas vivos ou seus produtos de secreção (Harrison et al., 1989). Já a detecção de antígenos circulantes (Ag-ELISA) baseada no uso de anticorpo monoclonal (MAb) tem sido utilizada para o diagnóstico de infecção ativa embora tenha sensibilidade diagnóstica baixa em animais com pouca carga parasitária (Harrison et al., 1989; Brandt et al., 1992; Onyango-Abuje et al., 1996; Van Kerckhoven et al., 1998; Dorny et al., 2000; Paulan et al., 2013).

O uso de biossensores no campo da medicina tem permitido identificar e quantificar metabólitos de forma rápida, específica e em pequenos volumes de amostras biológicas (Alfaya & Kubota, 2002; Lowinsohn & Bertotti, 2006). Os imunossensores são biossensores cuja resposta bioquímica está ligada à interação antígeno-anticorpo, podendo ser utilizado para detecção de anticorpos ou de antígenos (Pereira et al., 2002; Ricardi et al., 2002).

O presente trabalho descreve o desenvolvimento do primeiro imunossensor para o diagnóstico da cisticercose bovina no mundo, na busca por maior rapidez, menor custo e facilidade de execução, vislumbrando sua aplicação para o diagnóstico *ante mortem* desta zoonose.

2. Material e Métodos

A fibroína da seda (SF, do inglês *silk fibroin*) foi extraída de casulos do bicho-da-seda (*Bombyx mori*) (Fiação de Seda BRATAC S.A., Brasil) e processada no Laboratório de Materiais Fotônicos (LAMF) do Instituto de Química da UNESP de Araraquara para remoção da sericina, segundo Rockwood et al. (2011). A solução de fibroína da seda foi mantida a 4°C e diluída em solução aquosa na concentração final de 0,1% para a produção dos filmes.

A quitosana testada na produção de filmes finos foi obtida comercialmente (Sigma[®]) e diluída segundo protocolo do fabricante, mantida a 4°C até o momento do uso, sendo utilizada a 0,2%, em solução aquosa.

O anticorpo monoclonal (TAEB) utilizado para crescimento dos filmes e imobilizado no imunossensor é da classe IgM, o qual foi produzido a partir de extrato antigênico bruto de metacestóides de *T. saginata* (Vicentini-Oliveira, 2010).

O antígeno de excreção/ secreção (E/S) de *T. saginata* foi obtido a partir de formas metacestóides de bovinos naturalmente infectados. Os metacestódeos foram lavados em solução salina tamponada (PBS) contendo solução de antibióticos e antimicótico a 10% (v/v) (Gibco[®]), mantidos em cultura com meio RPMI 1640 (Gibco[®]) suplementado com soro fetal bovino (SFB, Gibco[®]) a 10% em estufa a 37°C, com 5% de CO₂. Após 3 dias, o meio de cultura foi substituído por DMEM F12 (Gibco[®]) sem SFB, com troca do meio a cada 48 horas. Os cistos foram mantidos em cultura por 15 dias e, a cada troca, o meio de cultura retirado foi congelado em frascos estéreis, a -80°C. Os sobrenadantes coletados foram submetidos à diálise contra PBS durante 3 dias, a 4°C, com troca da solução a cada 12 horas, e liofilizados.

As amostras de soro de bovinos utilizadas nos testes foram gentilmente cedidas pelo Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular da Faculdade de Medicina Veterinária da UNESP de Araçatuba, sendo 3 de bezerros, 8 de

bovinos adultos negativos e 9 de bovinos positivos à inspeção sanitária, os quais apresentaram de 1 a 2 cistos, 1 bovino adulto com infecção experimental e 2 bovinos adultos provenientes de fazenda com alta taxa de infecção por *T. saginata* (não inspecionados).

2.1. Preparo dos filmes sobre substrato de quartzo

Lâminas de quartzo (substrato) foram imersas em solução aquosa de fibroína da seda (SF) a 0,1% ou de quitosana (Q) a 0,2%, durante 10 minutos, para adsorção do biopolímero na superfície. Em seguida, foram lavadas em água ultrapura (Milli Q, Millipore®) para a retirada das moléculas não adsorvidas. Após secagem com jato de nitrogênio comprimido (N₂) (primeira camada), as lâminas ficaram imersas por 10 minutos em PBS (pH 7,4) contendo o anticorpo monoclonal TAEB a 5µg/mL, foram lavadas em água ultrapura (Milli Q, Millipore®) e secas com nitrogênio comprimido (segunda camada) (Figura 1). Este procedimento foi repetido consecutivamente até a obtenção de 5 bicamadas de SF/TAEB ou Q/TAEB, totalizando 10 camadas em cada filme.

A cada camada foram realizadas medidas de espectroscopia de UV-visível (Hitachi High-Technologies Corporation, U-2900) para os espectros de absorção e medidas de fluorescência (Shimadzu Scientific Instruments Inc., RF5301PC) para os espectros de emissão de luz. O comprimento de onda de excitação usado para obtenção dos espectros foi de 280 nm, devido aos aminoácidos triptofano e tirosina presentes na fibroína da seda e nos anticorpos monoclonais. Esses procedimentos foram realizados no Laboratório de Polímeros Bernard Gross do Instituto de Física de São Carlos (IFSC) da USP de São Carlos.

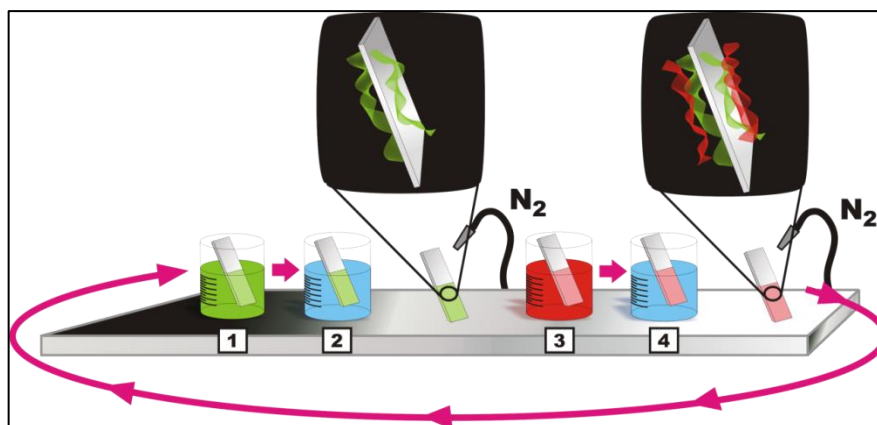


Figura 1: Esquematização do procedimento de preparo dos filmes automontados por meio da técnica camada por camada (*LbL*, do inglês *Layer-by-Layer*). As soluções 1 e 3 representam, respectivamente, a fibroína da seda e o anticorpo monoclonal e 2 e 4 representam a água ultrapura utilizada para lavagem e remoção de moléculas fracamente adsorvidas. Adaptado de Lima, 2014.

2.2 Preparo dos filmes sobre eletrodos impressos de carbono

Os eletrodos impressos de carbono foram adquiridos comercialmente (DropSens[®]). Em momentos distintos foram utilizados eletrodos com 1 (110, DropSens[®]) ou 2 (C1110, DropSens[®]) eletrodos de trabalho. Os eletrodos duplos foram utilizados para avaliar a especificidade do imunossensor, e os eletrodos simples (1 eletrodo de trabalho) para as demais análises.

Filmes automontados de SF e TAEB foram produzidos sobre os eletrodos de carbono, os quais receberam 1 bicamada (Figura 2a) ou 3 bicamadas (Figura 2b).

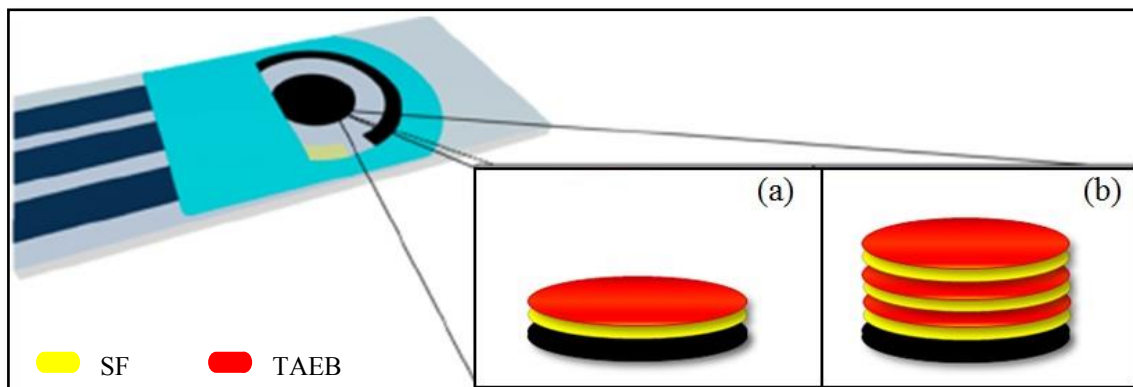


Figura 2: Representação esquemática dos filmes *LbL* de fibroína da seda e anticorpo TAEB (SF/ TAEB) com (a) 1 bicamada ou (b) 3 bicamadas depositadas sobre eletrodos impressos de carbono. Adaptado de Moraes et al., 2013.

Em ambos os casos, as camadas foram produzidas por deposição das soluções no eletrodo de trabalho utilizando-se micropipetas, até a total cobertura do mesmo. A solução de SF a 0,1% foi adsorvida durante dez minutos nos eletrodos com 3 bicamadas e, por quarenta minutos nos eletrodos com 1 bicamada. Todos foram lavados duas vezes com água ultrapura, secos e, em seguida, aplicou-se a solução de PBS (pH 7.4) com anticorpo TAEB, a 10 μ g/mL, obedecendo ao mesmo tempo de adsorção para a SF em cada caso. Após a incubação os eletrodos receberam duas lavagens com água ultrapura e foram utilizados após secagem.

2.3. Análises das amostras nos biossensores produzidos

2.3.1. Análises em sensores contendo dois eletrodos de trabalho

Os eletrodos duplos foram preparados de forma que, em um eletrodo foi depositada somente uma camada de fibroína da seda (SF1) e no outro uma bicamada de fibroína/ TAEB (SF1/TAEB1) (Figura 3). Para a primeira medida, adicionou-se a amostra de soro negativo sobre os eletrodos, durante 5 minutos e,

após lavagem com PBS (pH 7.4), os eletrodos foram recobertos com PBS (solução eletrolítica) para a obtenção do voltamograma cíclico. Em seguida, o mesmo procedimento foi realizado com a amostra de soro positivo.

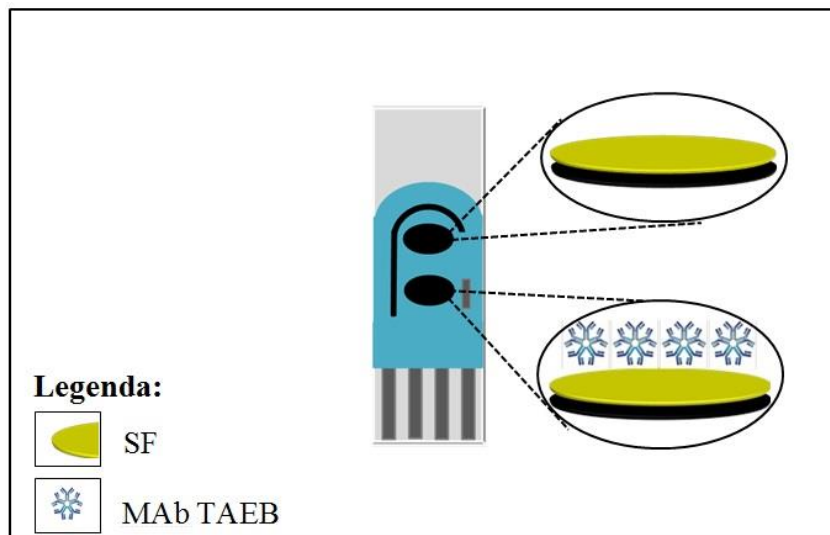


Figura 3: Representação esquemática dos filmes *LbL* de fibroína da seda e anticorpo TAEB (SF/ TAEB) em eletrodo com dois eletrodos de trabalho. Um dos eletrodos de trabalho contendo uma camada de SF e o outro 1 bicamada de SF/TAEB automontada.

2.3.2. Análises em sensores contendo um eletrodo de trabalho

Após a montagem dos eletrodos *Layer-by-Layer (LbL)*, foram realizados testes com antígeno de excreção/ secreção (E/S) de *T. saginata* em diferentes concentrações, e com amostras de soro bovino. Após a primeira medida realizada somente com PBS (curva basal), 20µL da amostra teste foram adicionados sobre o eletrodo de trabalho e incubados durante 10 minutos, a temperatura ambiente. Realizou-se uma lavagem do eletrodo com 200µL de PBS (pH 7.4) e a medição foi iniciada após total cobertura de toda a superfície do eletrodo com 200µL de PBS (solução eletrolítica) (Figura 4).



Figura 4. Eletrodos cobertos por 200 μ L solução eletrolítica (PBS pH 7.4).

2.4 Técnica de Voltametria Cíclica

A voltametria cíclica é uma técnica eletroquímica amplamente utilizada como critério de diagnóstico qualitativo dos processos que acontecem na interface. Utilizando como variáveis a velocidade de varredura e os potenciais iniciais e finais, é possível identificar processos de oxidação, redução e de adsorção/ dessorção e determinar se correspondem a um processo reversível ou irreversível (Ticianelli & Gonzalez, 2005). As informações de uma espécie química são obtidas a partir do registro de curvas corrente-potencial, que são registradas simultaneamente e chamadas voltamogramas (Pacheco et al., 2013).

Os voltamogramas cíclicos foram realizados em Bipotenciostato/ galvanostato μ -Stat 400 portátil (DropSens[®]) e analisados com software DropView (DropSens[®]). A velocidade de varredura utilizada foi de 0,05 V/s, com intervalo potencial de -0,6 a 0,6 V. Os dados obtidos foram analisados com o auxílio do software OriginPro 8 (OriginLab[®]).

2.5 Análise estatística

O cálculo de variação da corrente elétrica gerada nos voltamogramas cíclicos foi realizado de duas formas, após fixar o valor de potencial em 0,4V e encontrar o valor de corrente elétrica correspondente para cada amostra:

- a) Cálculo da razão entre dois pontos: $A\% = X/Y \times 100$, com A representando o aumento da corrente elétrica gerada em porcentagem (%);

- b) Cálculo da diferença entre dois pontos: $A = X - Y$, onde A representa em a diferença entre os dois valores de corrente obtidos.

Nos dois casos, X é o valor de corrente obtido após medida de uma amostra e Y é o valor da corrente obtido na curva basal (PBS).

Após a realização dos cálculos, os valores de dados descritivos foram obtidos com auxílio do software OriginPro 8 (OriginLab®) e definiu-se o ponto de corte clássico a ser utilizado nas análises, como sendo o valor da média das amostras negativas somado ao dobro do valor do desvio padrão ($médiaNEG + 2x DP$). Para os cálculos de especificidade e sensibilidade, aplicou-se o teorema de Bayes.

3. Resultados e Discussão

3.1 Crescimento dos filmes automontados SF/TAEB caracterizados por UV-visível

A adsorção da fibroína da seda e MAb TAEB sobre o substrato de quartzo foi monitorada, a cada camada depositada, por espectroscopia de UV-visível. A Figura 4 mostra o espectro de absorção para o crescimento do filme fibroína/TAEB até o total de 5 bicamadas depositadas.

A figura inserida (inserção - Figura 5) mostra a absorção em 280 nm *versus* o número de camada de SF e TAEB depositada. As duas primeiras camadas, que representam a adsorção do MAb TAEB sobre a fibroína (SF1/TAEB1, inserção - Figura 5), não apresentaram aumento na absorção, provavelmente porque o substrato não foi totalmente recoberto pelo material (Lobo et al., 2003). Observou-se um aumento linear ($R^2 = 0,97$) na absorbância até a terceira bicamada (SF3/TAEB3), indicando que a mesma quantidade de material foi adsorvida a cada camada depositada (Decher et al., 1992). Entretanto, para as camadas seguintes o mesmo não pode ser observado, o que

pode ser justificado pela dificuldade de absorção de múltiplas camadas após a adição do anticorpo TAEB, devido ao alto peso molecular (IgM = 900kDa).

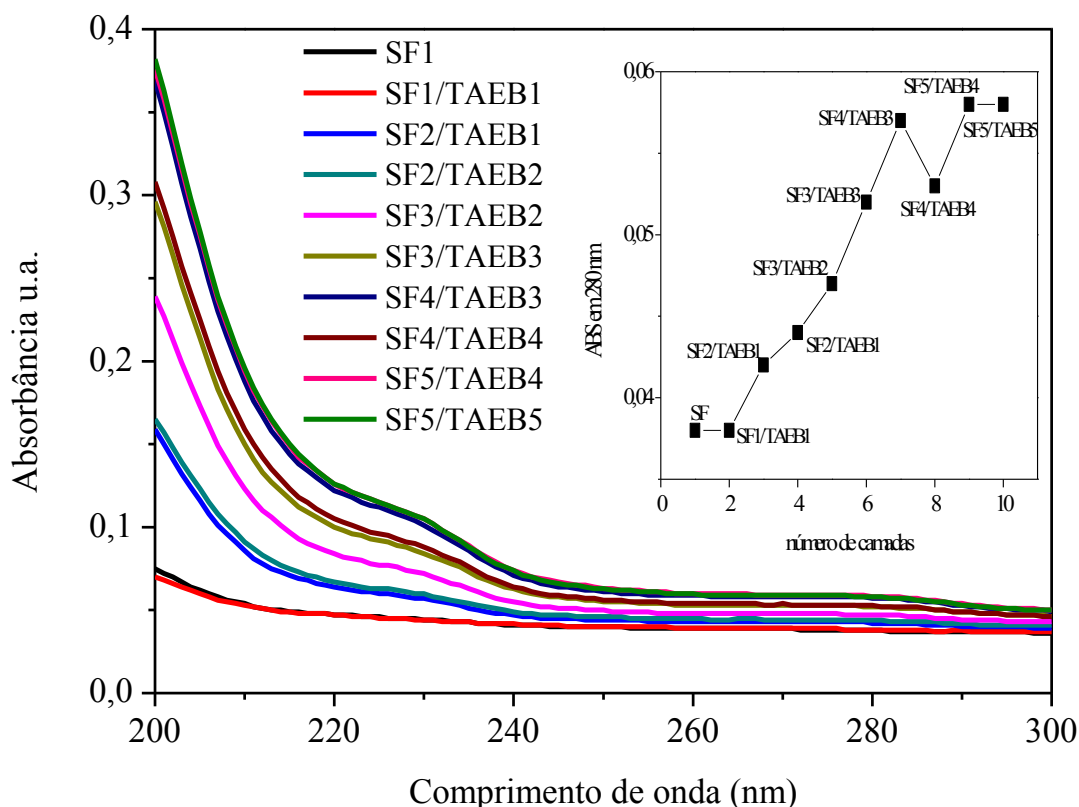


Figura 5. Espectros de absorção por UV-vis do filme de fibroína da seda/ TAEB, contendo bicamadas. **Inserção:** Aumento da absorção a 280nm em função do número de camadas depositadas (SF/ TAEB).

Com intuito de melhorar a imobilização do anticorpo, filmes automontados contendo quitosana como matriz de imobilização foram investigados. Entretanto, mesmo após 10 procedimentos de imersões alternadas em ambas as soluções (quitosana e TAEB), observou-se ausência de absorção das bicamadas. O mesmo foi observado nas análises de espectros de emissão por fluorescência (dados não mostrados). Assim, o uso da quitosana para esta finalidade foi excluído das etapas seguintes do presente trabalho.

3.2. Caracterização dos filmes por Análise de Fluorescência

Dentre os aminoácidos aromáticos (Triptofano, tirosina e fenilalanina), o mais utilizado para análise de alteração estrutural de proteínas e a interação com outras moléculas por espectroscopia de fluorescência é o triptofano (Lakowicz, 2006). O máximo de emissão da fibroína da seda em solução foi observado em 306 nm referente aos aminoácidos tirosina, presente em grande proporção na fibroína da seda, e uma contribuição distinta por volta de 340 nm que pode ser atribuído ao aminoácido triptofano presente na fibroína, quando exposto ao meio. Para o anticorpo monoclonal TAEB em solução o máximo de emissão foi observado em 338 nm que pode ser justificado pela presença do triptofano no anticorpo (Figura 6).

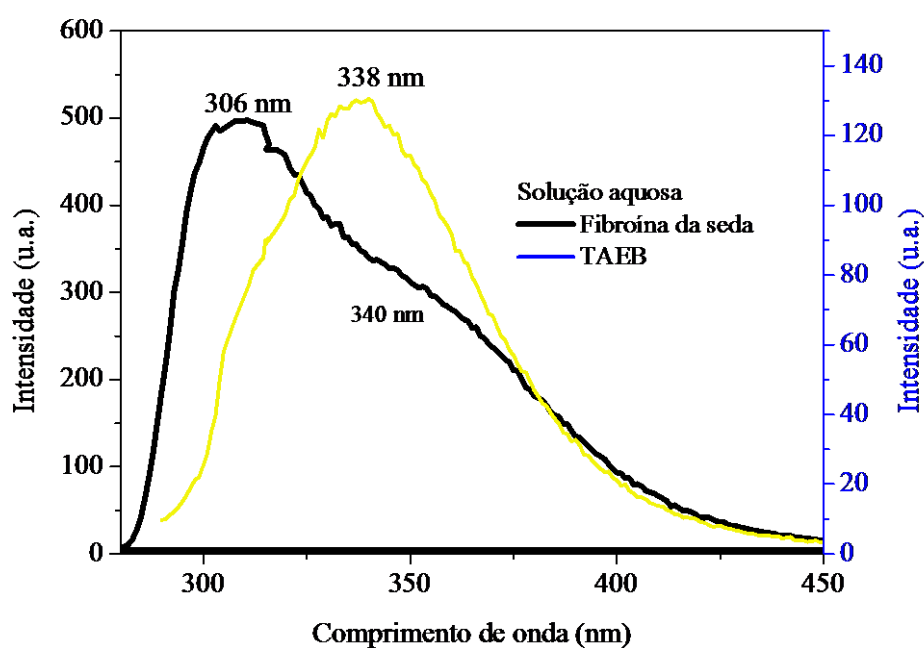


Figura 6. Espectros de fluorescência da fibroína da seda em solução aquosa (linha em preto) e do anticorpo monoclonal TAEB em solução (linha em azul), com excitação em 280nm.

Durante a formação do filme (sobreposição das camadas) foram realizadas as medições dos espectros de fluorescência a cada camada depositada. O máximo

de emissão para uma camada de fibroína da seda foi de 309 nm e um “ombro” em 363 nm, referente aos aminoácidos tirosina e triptofano, respectivamente. Nota-se que a emissão do triptofano teve um deslocamento de 23 nm no máximo de emissão que pode ser atribuído à conformação estrutural da fibroína que, quando em solução, apresenta uma estrutura secundária aleatória e em filmes automontados sua estrutura é predominantemente folha- β (Wang et al., 2005; Moraes et al., 2013). A adsorção do anticorpo monoclonal sobre a fibroína pode ser observada com o espectro de emissão SF1/TAEB1, ou seja, quando uma camada de TAEB foi adicionada à fibroína, com o máximo de emissão de 317 nm (Figura 7, linha em vermelho). Esse máximo é a soma do máximo de emissão da fibroína e do anticorpo monoclonal (Figura 7).

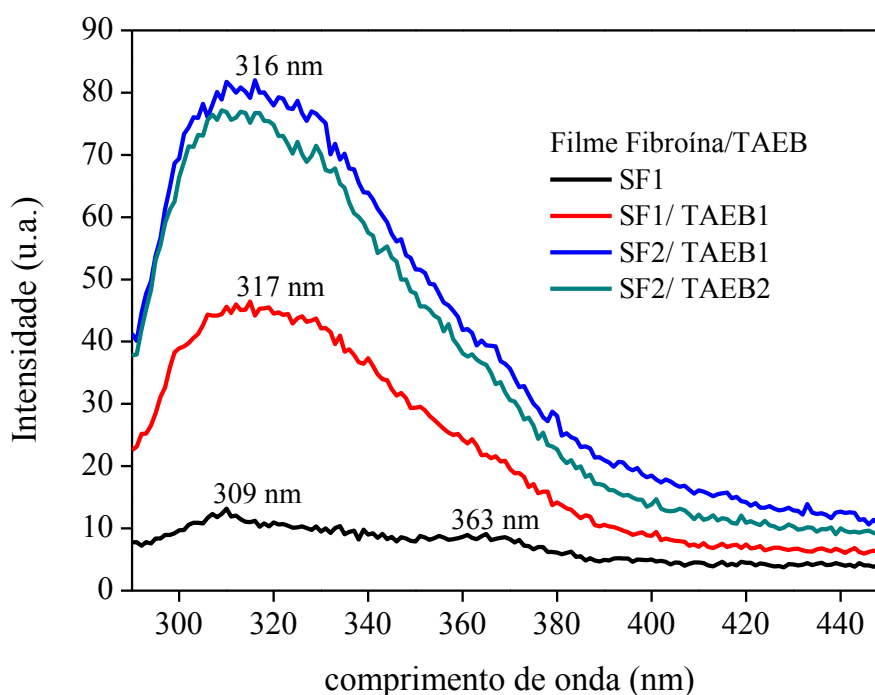


Figura 7. Espectros de fluorescência do filme automontado a cada camada de fibroína da seda (SF) e anticorpo (TAEB) até duas bicamadas, com excitação em 280nm.

A análise do gráfico da Figura 7 mostra que não houve aumento da fluorescência na segunda bicamada (SF2/TAEB2) após a adsorção do anticorpo à

fibroína (curva em verde). Este efeito pode ser atribuído ao alto peso molecular do MAb TAEB (IgM), causando a supressão da emissão.

3.3 Aplicação dos filmes de SF/ TAEB como imunossensor

3.3.1 Detecção Eletroquímica em sensores com dois eletrodos de trabalho

Os imunossensores com dois eletrodos de trabalho mostraram que há especificidade da ligação antígeno-anticorpo no sistema, após a incubação com amostra de soro positivo.

O eletrodo contendo somente a fibroína da seda não demonstrou alteração de corrente significativa entre as incubações com amostras de soro negativo e positivo (Figura 8, a). Entretanto, o eletrodo contendo a bicamada SF1/TAEB1 apresentou, após incubação com soro positivo, um pico próximo de 0,3V, com diferença de corrente de 1,1 μ A em comparação à curva do soro negativo (Figura 8, b). Essa diferença, portanto, pode ser atribuída à interação do antígeno ao anticorpo monoclonal, comprovando a especificidade do MAb TAEB, já que as medidas foram realizadas simultaneamente.

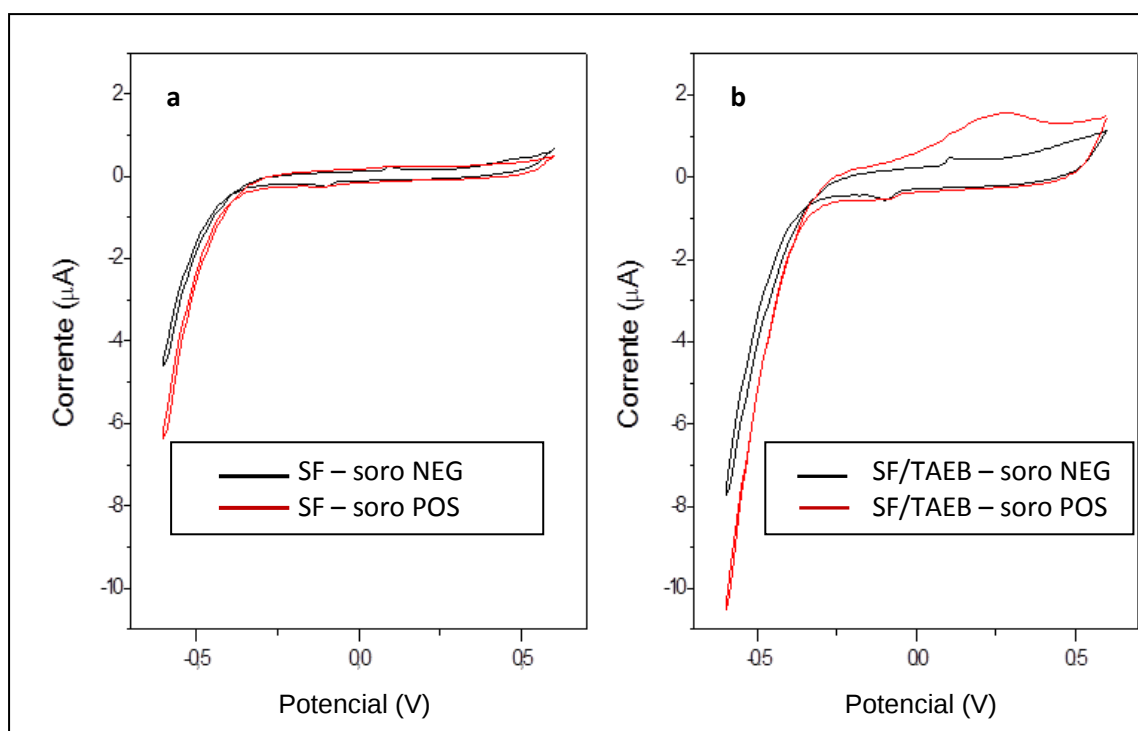


Figura 8. Voltamogramas cíclicos obtidos após incubação de soros negativos e positivos em eletrodo contendo somente fibroína da seda (SF) (a) e 1 bicamada de SF/TAEB (b).

3.3.2 Detecção Eletroquímica em sensores com um eletrodo de trabalho

Partindo dos resultados de crescimento dos filmes por UV-visível, a detecção eletroquímica nos eletrodos produzidos com três bicamadas (SF3/TAEB3) foi avaliada. Não foram observados resultados satisfatórios quando testados com amostras de soro dos animais (bovinos negativos e positivos), já que não foi possível diferenciar as respostas devido à sobreposição dos voltamogramas cíclicos (Figura 9).

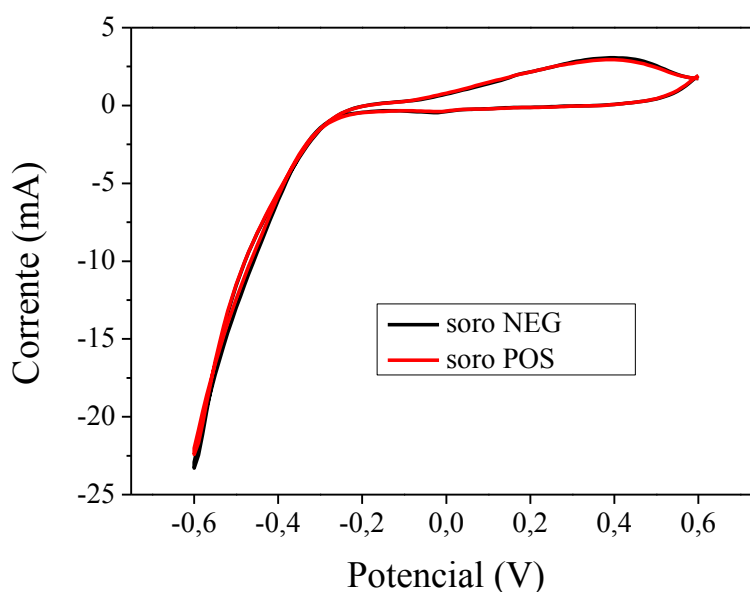


Figura 9. Voltamogramas cíclicos obtidos após incubação de soro negativo e positivo em eletrodos produzidos com 3 bicamadas de fibroína da seda e anticorpo TAEB.

Desta forma, e em virtude dos resultados observados no crescimento dos filmes por fluorescência, optou-se pela utilização de filmes automontados com SF e TAEB sobre eletrodos de carbono contendo somente 1 bicamada. Para melhorar a imobilização do anticorpo sobre uma camada de fibroína e, na tentativa de aumentar a eficiência do bloqueio de sítios não preenchidos do eletrodo, aumentou-se o tempo de adsorção da fibroína e do anticorpo para 40 minutos cada.

Estão ilustrados na Figura 10 os voltamogramas cíclicos obtidos na produção do filme com 1 bicamada sobre o eletrodo, cujas medidas foram realizadas com PBS a cada etapa da formação do filme. O primeiro voltamograma cíclico (linha em preto) representa a amplitude da corrente no eletrodo contendo somente a camada de fibroína da seda. O voltamograma cíclico após a adsorção do anticorpo monoclonal TAEB (linha em vermelho) exibiu, em relação à situação anterior (SF), uma redução da corrente elétrica em aproximadamente $7\mu\text{A}$ (Figura 10, seta azul). Acredita-se que a redução da

corrente para potenciais baixos pode ser atribuída à redução das espécies gerada pela adsorção do anticorpo na superfície do eletrodo.

Observa-se também um aumento da corrente elétrica do ciclo catódico, demonstrando que existe um processo de oxidação após a ligação com o anticorpo (Figura 10 – inserção). Estes dados corroboram as medidas de UV-visível e fluorescência, evidenciando a adsorção do TAEB sobre a fibroína da seda.

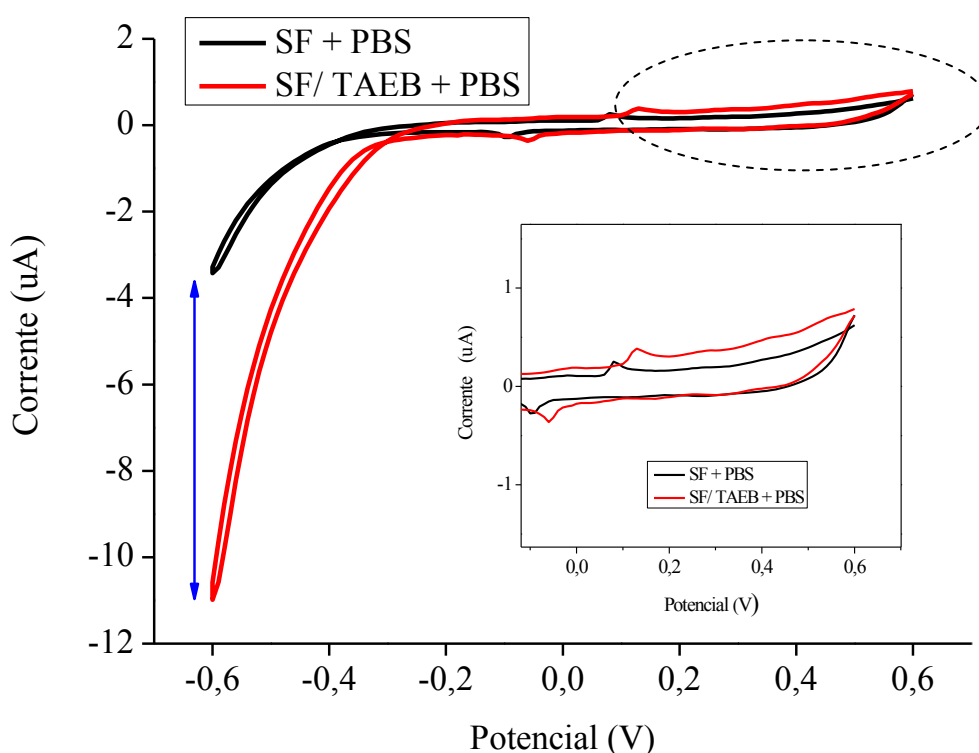


Figura 10. Voltamograma cíclico evidenciando a alteração de corrente após a fixação do anticorpo monoclonal sobre a fibroína da seda (seta azul). **Inserção:** ampliação da área indicada mostra o aumento da corrente no ciclo catódico após a fixação do MAb TAEB sobre a fibroína da seda.

O imunossensor produzido contendo 1 bicamada de SF/TAEB foi testado frente a diferentes concentrações de antígeno E/S de *T. saginata*. A Figura 11 mostra a resposta do filme frente às diluições de E/S em PBS, que variaram de

0,01 μ g/mL a 5,0 μ g/mL. O imunossensor descrito foi capaz de detectar o antígeno em soluções de 0,1 μ g/mL até 5,0 μ g/mL (Figura 11).

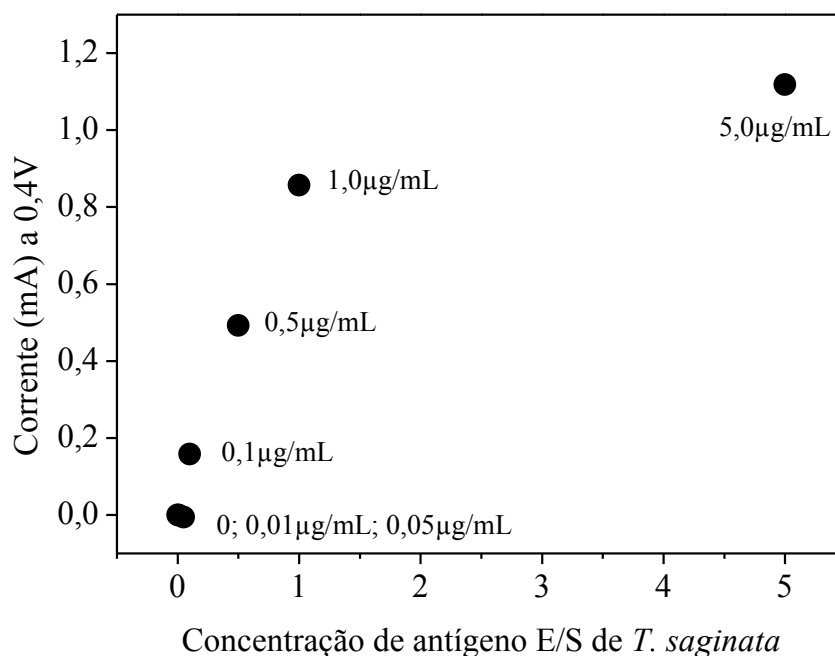


Figura 11. Curva analítica dos filmes automontados contendo 1 bicamada de fibroína/TAEB na presença de diferentes concentrações de antígeno E/S de *T. saginata*: 0,01 μ g/mL; 0,05 μ g/mL; 0,1 μ g/mL; 0,5 μ g/mL; 1,0 μ g/mL; 5,0 μ g/mL).

Não foi possível, entretanto, calcular a sensibilidade do imunossensor através da curva, visto que para os valores testados, a curva analítica não apresentou adequada linearidade ($R^2 = 0,64$). Nesta proposta, portanto, validou-se a identificação do antígeno nas amostras de soro bovino de forma qualitativa, ou seja, somente quanto à sua presença ou ausência.

3.3.3 Análise dos imunossensores com amostras de soro de bovinos

A partir da análise de três amostras de soro de bezerros (comprovadamente não infectados por *T. saginata*), foi produzido um voltamograma cíclico com barras de erro como uma curva padrão, obtido através

das médias das amostras soronegativas para cisticercose bovina (bezerros) com desvio padrão ponto a ponto (Figura 12, curva em vermelho). Os voltamogramas cíclicos produzidos pelas amostras restantes (soros negativos e positivos) foram comparados à esta curva para análise inicial dos resultados obtidos.

O voltamograma cíclico destacado em azul (Figura 12, a) refere-se à medida de amostra de soro bovino negativo à inspeção visual, juntamente com o voltamograma com barras de erro, mostrando a manutenção da curva teste dentro da curva padrão. Já o voltamograma em verde é resultado da leitura após incubação de amostra de soro positivo à inspeção sanitária, ou seja, o animal possuía cisticercos na musculatura e, conseqüentemente, antígenos de *T. saginata* circulantes (Figura 12, b). Neste voltamograma observa-se aumento na densidade de elétrons entre os potenciais 0,3V e 0,6V, isto é, as curvas referentes às medidas de amostras infectadas aumentam em relação à curva padrão de sinal negativo.

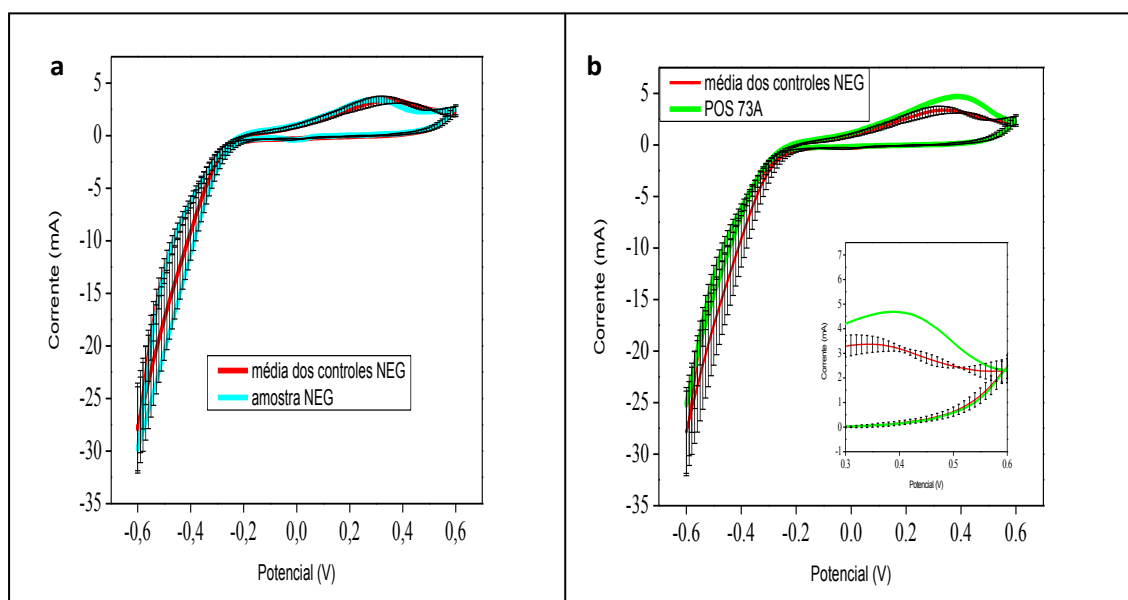


Figura 12. Voltamogramas cíclicos dos filmes *Layer-by-Layer* de SF/TAEB com 1 bicamada, na presença de soros-controle negativos (curva em vermelho), **a:** amostra negativa para cisticercose segundo a inspeção visual (curva em azul), e **b:** amostra positiva para cisticercose bovina (curva em verde). **Inserção:** região de detecção ampliada.

A especificidade foi de 100%, considerando as 8 amostras negativas testadas, de forma que as curvas produzidas após incubação de cada amostra de soro animal sem cisticercose mantiveram-se dentro da curva de média com desvio padrão. A sensibilidade apresentada foi menor (58,3%), sendo que das 12 amostras de animais com cisticercose, 5 também apresentaram voltamogramas cíclicos que permaneceram na curva de média dos animais negativos, ou seja, baseado nessa análise, seriam classificados como não portadores de cisticercose (falso-negativos) (dados não mostrados). A principal dificuldade no diagnóstico da cisticercose em bovinos é conseguir detectar os animais com baixa carga parasitária, como as amostras de onze bovinos utilizados neste trabalho. Estes resultados assemelham-se aos das pesquisas que utilizaram o teste de ELISA sanduíche para detecção de antígenos circulantes de *T. saginata* em bovinos (Harrison et al., 1989; Brandt et al., 1992; Onyango-Abuje et al., 1996; Van Kerckhoven et al., 1998; Dorny et al., 2000; Paulan et al., 2013). A dificuldade da transdução eficiente da ligação antígeno-anticorpo em sinal detectável e útil, sem a participação de uma reação enzimática, já foi relatada (North, 1985).

Uma constatação importante foi a grande variação observada entre os voltamogramas basais, ou seja, aqueles produzidos somente com adição da solução eletrolítica (PBS) sobre o eletrodo (dados não mostrados). Esses voltamogramas foram feitos em todos os imunossensores, antes da incubação das amostras. Vale lembrar que para cada amostra foi utilizado um eletrodo diferente. Dessa forma, a falta de homogeneidade nos voltamogramas cíclicos basais, resultou em dificuldade na comparação dos resultados entre todas as amostras testadas.

Devido à variação observada nos voltamogramas basais, buscou-se normalizar os valores obtidos de corrente através de duas formas de análises dos dados. Assim, após fixar o valor de potencial em 0,4V verificou-se o valor correspondente da corrente elétrica para cada voltamograma cíclico das amostras e das suas respectivas curvas basais (PBS) (Figura 13).

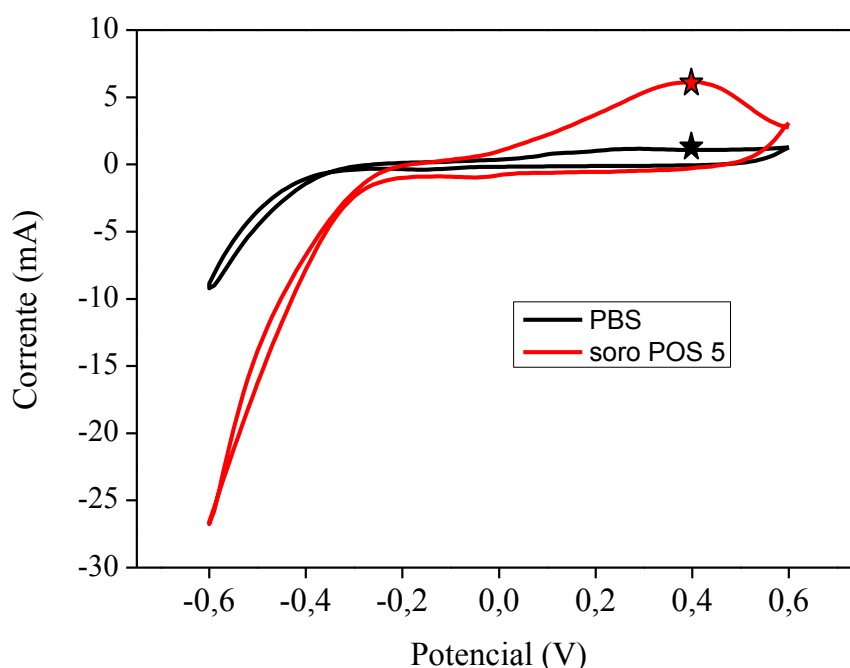


Figura 13. Voltamogramas cíclicos obtidos em eletrodo com 1 bicamada de SF/TAEB de curva basal (PBS) e curva após incubação de amostra de soro bovino com cisticercose. Destaque para os pontos selecionados para normalização dos resultados (★).

As análises estatísticas foram realizadas considerando-se que os 8 animais classificados como negativos na inspeção visual são verdadeiramente negativos, perfazendo um total de 11 amostras de soro negativas e 12 amostras de soro positivas.

Os valores de sensibilidade e especificidade do teste, considerando-se a porcentagem de aumento de corrente ($A\% = X/Y \times 100$), foram de 67% e 91,0%, respectivamente. Considerando-se somente a diferença entre os valores de corrente ($A = X - Y$), obteve-se 83% de sensibilidade e 100% de especificidade. Apesar do pequeno número de amostras analisado, estes resultados são semelhantes ou mais promissores em relação aos obtidos por outros pesquisadores utilizando a técnica de ELISA sanduíche para diagnóstico de antígenos circulantes em bovinos (Harrison et al., 1989; Brandt et al., 1992;

Minozzo et al., 2004; Monteiro et al., 2006; Ogunremi & Benjamin, 2010). Em virtude dos resultados obtidos, um comunicado de inovação para o protótipo de imunossensor no diagnóstico da cisticercose bovina foi submetido à Agência UNESP de Inovação (AUIN), para análise de pedido de patente.

4. Conclusões

O imunossensor desenvolvido no presente trabalho apresentou resultados promissores para aplicação futura no diagnóstico da cisticercose bovina e a fibroína da seda confirmou ser uma excelente matriz de imobilização para o anticorpo monoclonal.

Em virtude dos resultados observados, existe a necessidade de buscar melhorias na produção do imunossensor, de forma a reduzir a variação das análises entre os eletrodos. Faz-se necessária também a realização de testes com um painel maior de amostras de soros bovinos para garantir a validação do imunossensor como método diagnóstico.

Diversas propostas para melhorar a sensibilidade do imunossensor são possíveis e deverão ser estudadas futuramente, como a utilização de anticorpo monoclonal produzido contra antígenos E/S de *Taenia saginata*, a substituição do anticorpo monoclonal de classe IgM por outro da classe IgG, além da utilização de anticorpo de reconhecimento do antígeno marcado com enzima. Espera-se que, em breve, este mesmo sensor possa ser avaliado quanto à sua aplicabilidade no diagnóstico de pacientes com neurocisticercose. Vale ressaltar que esta é a primeira descrição de um imunossensor para o diagnóstico rápido da cisticercose bovina.

Agradecimentos

À Rede Nanobiotec – Capes (04/2009) pela bolsa de estudos e ao Laboratório de Bioquímica Animal e Biologia Molecular da Faculdade de Medicina Veterinária – UNESP de Araçatuba por fornecer as amostras de soro bovino.

Referências

- Alfaya, AAS; Kubota, LT. A utilização de materiais obtidos pelo processo de SOL-GEL na construção de biossensores. Quím. Nova. 25(5): 835-841, 2002.
- Almeida, LP; Reis, DO; Moreira, MD; Palmeira, SBS. Cisticercos em bovinos procedentes de Minas Gerais e abatidos em frigoríficos de Uberlândia - MG, no período de 1997 a 2001. Rev. Hig. Alimentar. 20(139): 40-43, 2006.
- Brandt, J; Geerts, S; De Deken, R; Kumar, V; Ceulemans, F; Brys, L; Falla, N. A monoclonal antibody based ELISA for the detection of circulating excretory-secretory antigens in *Taenia saginata* cysticercosis. Int. J. Parasitol. 22: 471-477, 1992.
- Brasil. Ministério da Agricultura. Regulamento da inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal - RIISPOA. Decreto nº 30.691/1952, Brasília: Ministério da Agricultura. 154p, 1952.
- Decher, G; Hong, JD; Schmitt, J. Buildup of ultrathin multilayer films by a self-assembly process: III. Consecutively alternating adsorption of anionic and cationic polyelectrolytes on charged surfaces. Thin. Solid Films. 210/211: 831-835, 1992.
- Dorny, P; Vercammen, F; Brandt, J; Vansteenkiste, W; Berkvens, D; Geerts, S. Sero-epidemiological study of *Taenia saginata* cysticercosis in Belgian cattle. Vet. Parasitol. 88:43-49, 2000.
- Dorny, P; Phiri, I; Gabriel, S; Speybroeck, N; Vercruysse, J. A sero-epidemiological study of bovine cysticercosis in Zambia. Vet. Parasitol. 104: 211-215, 2002.
- Draelants, E; Hofkens, E; Harding, E; Brandt, J; Geerts, S. Development of a dot-enzyme immunoassay for the detection of circulating antigen in cattle infected with *Taenia saginata* cysticerci. Res. Vet. Science. 58: 99-100, 1995.
- Dutra, LH; Giroto, A; Vieira, RFC; Vieira, TSWJ; Zangirolamo, AF; Marquês, FAC.; Headley, SA; Vidotto, O. The prevalence and spatial epidemiology of cysticercosis in slaughtered cattle from Brazil. Semina: Ciências Agrárias. 33(5): 1887-1896, 2012.

- Fernandes, JOM, Buzetti WAS. Prevalência de Cisticercose Bovina em animais abatidos em frigoríficos sob Inspeção Federal, da 9ª região administrativa de Araçatuba, SP. Rev. Hig. Alimentar. 15(87): 30-37, 2001.
- Harrison, LJS; Joshua, GWP; Wright, SH; Parkhouse, RME. Specific detection of circulating surface/secreted glycoproteins of viable cysticerci in *Taenia saginata* cysticercosis. Parasite Immunol. 11: 351-370, 1989.
- Hoberg, EP. *Taenia tapeworms*: their biology, evolution and socioeconomic significance. Microbes Infect. 4(8): 859-866, 2002.
- Lakowicz, JR. Principles of fluorescence spectroscopy. Springer: New York, 2006.
- Lightowlers, MW; Rolfe, R; Gauci, CG. *Taenia saginata*: Vaccination against Cysticercosis in Cattle with Recombinant Oncosphere Antigens. Exp. Parasitol. 84: 330-338, 1996.
- Lima, LR. *Imunossensores à base de filmes nanoestruturados de fibroína da seda – peptídeo antigênico NS5A-1-vanadato de ítrio: európio para detecção de Hepatite C*. 2014. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Araraquara.
- Lobo, RFM; Pereira-da-Silva, MA; Raposo, M; Faria, RM; Oliveira Jr, ON. The morphology of *Layer-by-Layer* films of polymer/polyelectrolyte studied by atomic force microscopy. Nanotechnol. 14: 101-108, 2003.
- Lowinsohn, D; Bertotti, M. Sensores eletroquímicos: considerações sobre mecanismos de funcionamento e aplicações no monitoramento de espécies químicas em ambientes microscópicos. Quím. Nova. 29(6): 1318-1325, 2006.
- Minozzo, JC; Thomaz-Soccol, V; Olortegui, CC; Soares, VE; Costa, AJ. Teste imunoenzimático (enzyme-linked immunosorbent assay) para diagnóstico da cisticercose bovina e estudo da cinética da produção de anticorpos contra *Cysticercus bovis*. Ciência Rural. 34(3): 857-864, 2004.
- Monteiro, LL; Pinto, PSA; Dias, FS. Evaluation of the ELISA test for the antibody detection in cattle naturally and experimentally infected with *Cysticercus bovis*. Vet. Parasitol. 141: 260-263, 2006.
- Moraes, ML; Lima, LR; Silva, RR; Cavicchioli, M; Ribeiro, SJL. Immunosensor based on immobilization of antigenic peptide NS5A-1 from HCV and silk fibroin in nanostructured films. Langmuir. 29: 3829-3834, 2013.
- Neves, DP; Melo, AL; Linardi, PM; Vitor, RWA. Parasitologia Humana. 9a ed. São Paulo: Atheneu, 1998.
- North, JR. Immunosensors: Antibody-based biosensors. Trends Biotechnol. 3(7): 180-186, 1985.
- Ogunremi, O; Benjamin, J. Development and field evaluation of a new serological test for *Taenia saginata* cysticercosis. Vet. Parasitol. 169: 93-101, 2010.
- Onyango-Abuje, JA; Hughes, G; Opicha, M; Nginyi, KM; Rugutt, MK; Wright, SH; Harrison, LJS. Diagnosis of *Taenia saginata* cysticercosis in Kenyan cattle by antibody and antigen ELISA. Vet. Parasitol. 61: 221-230, 1996a.

- Onyango-Abuje, JA; Nginyi, JM; Rugutt, MK; Wright, SH; Lumumba, P; Hughes, G; Harrison, LJS. Seroepidemiological survey of *Taenia saginata* cysticercosis in Kenya. *Vet. Parasitol.* 64: 177-185, 1996b.
- Pacheco, WF; Semaan, FS; Almeida, VGK; Ritta, AGSL; Aucélio, RQ. Voltametrias: uma breve revisão sobre conceitos. *Rev. Virtual Quim.* 5(4): 516-537, 2013.
- Paulan SC, Gonzáles RMH, Peralta LA, Vicentini-Oliveira JC, Biondi GF, Conde ES, Parkhouse RME, Nunes CM. Usefulness of serological ELISA assay for *Taenia saginata* to detect naturally infected bovines. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 22(2): 270-275, 2013.
- Pereira, AC; Santos, AS; Kubota, LT. Tendências em modificação de eletrodos amperométricos para aplicações eletroanalíticas. *Quím. Nova.* 25: 1012-1021, 2002.
- Ricardi, ES; Costa, PI; Yamanaka, H. Imunossensor Amperométrico. *Quím. Nova.* 25: 316-320, 2002.
- Rockwood, DN; Preda, RC; Yücel, T; Wang, X; Lovett, ML; Kaplan, DL. Materials fabrication from *Bombyx mori* silk fibroin, *Nature Protocols.* 6(10): 1612–1631, 2011.
- Ticianelli, EA; Gonzalez, EL. Eletroquímica: Princípios e Aplicações. 2 ed. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, 2005, 235p.
- Van Kerckhoven, I; Vansteenkiste, W; Claes, M; Geerts, S; Brandt, J. Improved detection of circulating antigen in cattle infected with *Taenia saginata* metacestodes. *Vet. Parasitol.* 76: 269-274, 1998.
- Vicentini-Oliveira JC, Golim MA, Paulan SC, Biondi GF, Rossi-Ferreira R, Deffune E, Nunes CM. *Taenia saginata*: Production and characterization of monoclonal antibodies against *Taenia saginata* metacestode antigens. *Exp. Parasitol.* 126: 621-625, 2010
- Wang, X; Kim, HJ; Xu, P.; Matsumoto, A; Kaplan, DL. Biomaterial Coatings by Stepwise Deposition of Silk Fibroin. *Langmuir.* 21: 11335-11341, 2005.
- WHO. Taeniasis/ cysticercosis. Fact sheet N° 376, 2014. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs376/en/>

VICENTINI-OLIVEIRA, J.C. **Imunossensor para o diagnóstico sorológico da cisticercose bovina**. Botucatu, 2014. 26p. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista

Resumo

A cisticercose bovina é um problema importante na cadeia de produção da carne e seu diagnóstico é realizado, rotineiramente, durante o abate. O objetivo deste trabalho foi desenvolver uma ferramenta para o diagnóstico *ante-mortem* da cisticercose bovina, de forma a minimizar as perdas econômicas e controlar esta zoonose. Assim, um imunossensor baseado na imobilização de um anticorpo monoclonal contra o antígeno de *Taenia saginata* e da fibroína de seda foi desenvolvido para diagnóstico sorológico da cisticercose bovina. Inicialmente, a eficiência de fibroína de seda como matriz de imobilização para o anticorpo testado foi provado, bem como a especificidade do anticorpo monoclonal imobilizado quanto ao reconhecimento antigênico de antígenos de excreção/secreção de *T. saginata*. O imunossensor foi capaz de detectar antígenos circulantes em animais com baixa carga parasitária. Os resultados obtidos com as amostras de soro de bovino testadas variaram entre 58,3% e 83% de sensibilidade, e 91% e 100% de especificidade do teste, dependendo do método de análise. O imunossensor é uma ferramenta promissora para o diagnóstico *ante-mortem* da cisticercose bovina em uma abordagem rápida, simples e de baixo custo.

Palavras-chave: Imunossensor, anticorpo monoclonal, *Taenia saginata*, cisticercose bovina, fibroína da seda, diagnóstico.

VICENTINI-OLIVEIRA, J.C. **Immunosensor for the serological diagnosis of bovine cysticercosis**. Botucatu, 2014. 26p. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista

Abstract

Bovine cysticercosis is an important problem in the meat production chain and its diagnosis is routinely performed during slaughter. The objective of this research was to develop a tool for *ante-mortem* bovine cysticercosis diagnosis in such a way as to minimize the economic losses and control this zoonosis. Thus, an immunosensor based on the immobilization of a monoclonal antibody against *Taenia saginata* antigen and a silk fibroin was developed for bovine cysticercosis serodiagnosis. Initially, the silk fibroin efficiency as an immobilization matrix for the tested antibody was proven, as well as the immobilized monoclonal antibody antigenic recognition specificity to *T. saginata* excretory-secretory antigens. The immunosensor was able to detect circulating antigens in low worm burden animals. The results obtained with the bovine serum samples tested varied between 58,3% to 83% of sensitivity, and 91% to 100% for specificity of test, depending from the analysis method. The immunosensor is a promising tool for the bovine cysticercosis *ante-mortem* diagnosis in a fast, simple and low cost approach.

Keywords: Immunosensor, monoclonal antibody, *Taenia saginata*, bovine cysticercosis, silk fibroin, diagnosis.

CAPÍTULO 3

CAPÍTULO 3 - Trabalho Científico a ser enviado à *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária* – “Short communication”

“Produção de anticorpos monoclonais contra antígenos de excreção/secreção de metacestódeos de *Taenia saginata*”

Production of monoclonal antibodies against *Taenia saginata* metacestode excretory/secretory antigens

Josy Campanhã Vicentini de Oliveira¹, Aparecida Vitória Gonçalves de Souza², Márjorie de Assis Golim³, Rosana Rossi-Ferreira³, Elenice Deffune³, Cárís Maroni Nunes⁴, Germano Francisco Biondi^{1*}

¹ Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” – UNESP, Botucatu, SP, Brasil

² Departamento de Anestesiologia da Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB), Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” – UNESP, Botucatu, SP, Brasil

³ Hemocentro de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” – UNESP, Botucatu, SP, Brasil

⁴ Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” – UNESP, Araçatuba, SP, Brasil

*** Corresponding author:** Germano Francisco Biondi

Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, Distrito de Rubião Junior s/n, CEP 18618-970, Botucatu, SP, Brasil

email: gfbion@gmail.com, germano@fmvz.unesp.br

Introdução

A cisticercose bovina, causada pelo cestódeo *Taenia saginata*, é uma zoonose distribuída mundialmente (MURREL, 2005) e apontada como uma das principais causas de prejuízos econômicos por condenação de carcaças no Brasil (FERNANDES & BUZETTI, 2001; ALMEIDA, 2006).

O diagnóstico da cisticercose bovina no Brasil é realizado pela inspeção da carne após o abate dos animais, mas apresenta sensibilidade limitada quando os animais são levemente infectados (HARRISON et al., 1989; HAYUNGA et al., 1991; DRAELANTS et al., 1995; DORNY et al., 2000; ABUSEIR et al., 2006).

O uso de anticorpos monoclonais para detecção de antígenos de excreção/secreção (E/S) de *T. saginata* em teste ELISA sanduíche (Ag-ELISA) é uma alternativa para o diagnóstico *ante-mortem* de infecção ativa e tem apresentado resultados promissores quanto ao aumento da sensibilidade diagnóstica, sendo de 2 a 10 vezes mais sensível que a inspeção visual, embora ainda pouco eficiente na identificação dos animais com baixa carga parasitária (HARRISON et al., 1989; BRANDT et al., 1992; ONYANGO-ABUJE et al., 1996; VAN KERCKHOVEN et al., 1998; DORNY et al., 2000; PAULAN et al., 2013).

Os primeiros anticorpos monoclonais produzidos para diagnóstico sorológico da cisticercose bovina por Ag-ELISA reconhecem diferentes frações antigênicas dependendo do antígeno utilizado. O MAb HP10, um dos mais utilizados, identifica frações de antígeno E/S de *T. saginata* com peso molecular de 14, 23, 30 e 43kDa, bem como entre 155-220kDa (HARRISON et al., 1989). Já os MAbs 12G5 e 2H8 reconheceram frações de 65, 87 e 100kDa em produtos de E/S (BRANDT et al., 1992). Joshua et al. (1990) observaram que moléculas de 12, 14, 16, 20 e 26 kDa de fluido vesicular de *T. saginata* que contém, sofreram precipitação com soro bovino com infecção experimental. Aparentemente, são essas moléculas que se mantêm por maior tempo após infecção do animal com o parasita, sugerindo maior potencial diagnóstico dessas

frações de menor peso molecular. No presente trabalho, foram produzidos e caracterizados anticorpos monoclonais contra antígenos de excreção/secreção de *Taenia saginata*, visando sua aplicação futura em diferentes métodos de diagnóstico sorológico da cisticercose bovina.

Material e Métodos

O presente trabalho foi realizado após aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP de Botucatu (CEUA 116/2011).

Antígeno

As formas metacestóides de *Taenia saginata* foram obtidas de bovinos com infecção natural, abatidos em estabelecimento frigorífico (Frigol). Assim que dissecados, os metacestódeos foram lavados com solução salina tamponada (PBS) estéril e antibióticos a 10% (v/v) (Gibco[®], 15240-062) e mantidos em cultura com RPMI 1640 (Gibco[®]) suplementado (Soro fetal bovino a 10%, v/v - Gibco[®]), a 37°C, com 5% de CO₂. Após três dias, passou-se a utilizar o meio DMEM F12 (Gibco[®]) sem suplementação, com substituição a cada 48 horas. Os metacestódeos foram mantidos em cultura por 15 dias e os sobrenadantes de cultura contendo o antígeno E/S de *T. saginata* foram armazenados a -80°C. Todos os sobrenadantes foram dialisados contra PBS a 4°C e liofilizados. No momento do uso, o antígeno foi ressuspenso em PBS com inibidores de protease (PMSF 25mM, Sigma[®]).

Produção dos anticorpos monoclonais

Três camundongos BALB/c foram imunizados com 50µg de antígeno E/S de *T. saginata*, com adjuvante de alumínio nos dias 0, 14 e 21, via

intraperitoneal; no dia 30 os animais receberam um reforço de imunização via endovenosa, sem adjuvante. As fusões celulares foram realizadas por co-centrifugação dos esplenócitos obtidos dos camundongos imunizados, as células mieloma múltiplo murino NS/1 (10:1) e polietilenoglicol (PEG, PM 4000) (KÖHLER & MILSTEIN, 1975). A suspensão de células obtidas foi distribuída em microplacas de 96 cavidades, contendo meio RPMI 1640 enriquecido em aminoácidos, antibióticos e antifúngicos (10%, v/v, Gibco[®], 15240-062) e soro fetal bovino (20%, v/v, Gibco[®]). Durante os 15 dias subsequentes, adicionou-se ao meio de cultura o suplemento contendo hipoxantina/ aminopterina/ timidina (HAT, Gibco[®]). Para favorecer o crescimento celular, timócitos obtidos de camundongo jovem (*feeders cells*) foram adicionados às placas de cultura, três dias após a fusão celular.

Os hibridomas (TAES) que se desenvolveram foram marcados para coleta de sobrenadante de cultura (SNC) e triagem por teste ELISA indireto (VICENTINI-OLIVEIRA et al., 2010), visando determinar a presença de anticorpos específicos. As células produtoras de anticorpos que se mantiveram reagentes por quatro testes consecutivos foram clonadas por diluição limitante em microplaca (HARLOW & LANE, 1988). Os clones TAES obtidos foram testados por ELISA indireto com o antígeno de E/S de *T. saginata* e aqueles que obtiveram alta reatividade foram expandidos em volumes crescentes de meio de cultura, para produção de maiores volumes de anticorpos. Os clones produzidos foram criopreservados em solução de soro fetal bovino com 10% de dimetilsulfóxido (DMSO), a -196°C.

Caracterização dos anticorpos monoclonais

Para determinação de classe e subclasse dos MAbs produzidos, fundamental para a escolha dos mesmos, utilizou-se o kit *Mouse Immunoglobulin Isotyping* (BD Biosciences[®], 550026) segundo as instruções do fabricante, por

citometria de fluxo. As análises foram realizadas com software *Cell Quest* – BD[®] em gráficos de “*dot plot*”.

Os MAbs produzidos foram purificados, a partir dos sobrenadantes de cultura, por cromatografia em colunas comerciais com afinidade para anticorpos de classe IgG (HiTrap rProtein A FF, GE Healthcare[®]), em equipamento ÄKTA Prime Plus (GE Healthcare[®]).

Para separação das frações antigênicas, o antígeno E/S de *T. saginata* (30µg/ canaleta) foi submetido à corrida eletroforética em gel de poliacrilamida a 12%, contendo duodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) (LAEMMLI, 1970) e corado com azul de coomassie. Para o *Western blotting* (WB), após a separação das frações antigênicas por eletroforese (SDS-PAGE), houve a transferência para membrana de nitrocelulose (Bio-Rad[®] - 0,45µm), em sistema semi-seco (Biorad Trans-Blot[®] SD Semi-Dry Transfer Cell), empregando-se um potencial de 10V, por 40 minutos, em tampão 25mM Tris/Glicina/Metanol, a 4°C. Após a transferência, as membranas foram bloqueadas por 18 horas em tampão PBS (0,01M PO₄³⁻/0,15M NaCl, pH 7,2) com 5% de leite em pó desnatado (blotto 5%) e incubadas, por 8 horas, com os MAbs TAES. Para detecção foi utilizado anticorpo polivalente (anti-IgG/A/M) de camundongo conjugado a fosfatase alcalina (Sigma[®]) diluído 1:1.000 em blotto 5%, por 60 minutos, à temperatura ambiente e, como substrato da enzima, a solução de 5-Bromo-4-Cloro-3-Indolil Fosfato/ NitroblueTetrazolium (BCIP/NBT) foi adicionada. Entre as diferentes fases, as tiras foram lavadas com blotto 5%, com exceção das lavagens posteriores à adição do anticorpo conjugado, em que se utilizou blotto 1%. Os sobrenadantes de cultura testados não sofreram diluição; já o anticorpo monoclonal purificado e as amostras de soro de camundongos pré e pós-imunização foram diluídas a 1:500 e 1:100, respectivamente, em blotto 5%.

Resultados e Discussão

A eletroforese em SDS-PAGE do antígeno E/S de *T. saginata* produzido, revelou a presença de várias frações antigênicas com peso molecular entre 10 e 250 kDa, sendo as principais frações entre 50 e 75kDa, e 10 e 20kDa (Figura 1).

Após as fusões celulares, foram obtidos 748 hibridomas em cultura dos quais apenas 5 mantiveram-se reagentes ao final das triagens realizadas por ELISA indireto. Os hibridomas com viabilidade celular igual ou acima de 90% foram clonados por diluição limitante, e triados por ELISA indireto, totalizando 88 clones TAES reagentes ao antígeno E/S de *T. saginata*.

Todos os MAbs produzidos pelos 88 clones foram caracterizados como classe/ subclasse IgG₁ por citometria de fluxo (Figura 2). Van Kerckhoven et al. (1998) demonstraram o aumento de sensibilidade e especificidade no ensaio Ag-ELISA (BRANDT et al., 1992) após substituir os MAbs de classe IgM por outros de classe IgG, confirmando que os clones obtidos na presente pesquisa tem potencial para serem utilizadas no diagnóstico sorológico da cisticercose bovina.

Os MAbs foram então purificados em coluna de afinidade específica para a IgG (Figura 3) resultando em concentração final, em média, de 0,6 mg/mL. A identificação imunológica por *Western blotting* dos sobrenadantes de cultura dos MAbs produzidos (TAES) mostrou o reconhecimento de frações antigênicas de baixo peso molecular (10-20kDa) (Figura 4, B1, B3, B4 e B5). O MAb TAES purificado (Figura 4, B2) reage com frações protéicas entre 15 e 20kDa.

Frações de antígenos de E/S de *T. saginata* de baixo peso molecular (< 30kDa) já foram relatadas por apresentarem reação com o anticorpo monoclonal HP10 (HARRISON et al., 1989) e com amostras de soros bovinos experimentalmente infectados (JOSHUA et al., 1990), comprovando-se a imunogenicidade dessas frações. Outros autores também consideram imunodominantes as proteínas de peso molecular inferior a 20kDa em antígenos de *T. solium* (GOTTSTEIN et al., 1987; TSANG et al., 1989; YANG et al., 1998)

e de *T. crassiceps* (ESPÍNDOLA et al., 2000). Sendo assim, os anticorpos monoclonais produzidos nesta pesquisa são bastante promissores para aplicação futura no diagnóstico da cisticercose.

Conclusões

Visto que o principal objetivo no diagnóstico *ante-mortem* da cisticercose bovina é a detecção de infecção ativa, os anticorpos monoclonais contra antígenos E/S de *T. saginata* produzidos neste trabalho possuem potencial para uso como ferramenta diagnóstica. Muito embora anticorpos monoclonais contra diferentes antígenos de metacestóides de *T. saginata* já tenham sido produzidos, a busca por novos anticorpos monoclonais com maior estabilidade e avidéz por antígenos circulantes, além da necessidade de produção nacional deste valioso insumo, justificam este trabalho.

Os anticorpos monoclonais produzidos nesta pesquisa serão, em breve, melhor caracterizados e testados para uso em métodos sorológicos para o diagnóstico da cisticercose em animais com infecções leves, permitindo monitorar o tratamento de bovinos naturalmente infectados, evitando assim, perdas econômicas e os prejuízos à saúde pública.

Agradecimentos

À Rede Nanobiotec-Capes (04/2009) pela bolsa de estudos.

Referências

Abuseir S, Epe C, Schneider T, Klein G, Kühne, M. Visual diagnosis of *Taenia saginata* cysticercosis during meat inspection: is it unequivocal? *Parasitol Res* 2006; 99(4): 405-409.

- Almeida LP de, Reis DO, Moreira MD, Palmeira SBS. Cisticercos em bovinos procedentes de Minas Gerais e abatidos em frigoríficos de Uberlândia - MG, no período de 1997 a 2001. *Rev Hig Alimentar* 2006; 20(139): 40-43.
- Brandt J, Geerts S, Deken R, Kumar V, Ceulemans F, Brys L, Falla N. A monoclonal antibody based ELISA for the detection of circulating excretory-secretory antigens in *Taenia saginata* cysticercosis. *Int J Parasitol* 1992; 22: 471-477.
- Dorny P, Vercammen F, Brandt J, Vansteenkiste W, Berkvens D, Geerts S. Sero-epidemiological study of *Taenia saginata* cysticercosis in belgian cattle. *Vet Parasitol* 2000; 88: 43-49.
- Draelants E, Hofkens E, Harding E, Brandt J, Geerts S. Development of a dot-enzyme immunoassay for the detection of circulating antigen in cattle infected with *Taenia saginata* cysticerci. *Res Vet Science* 1995; 58: 99-100.
- Espíndola NM, Gaspari EN, Nakamura PM, Vaz AJ. Production of monoclonal antibodies anti *Taenia-crassiceps* cysticerci with cross-reactivity with *Taenia solium* antigens. *Rev Inst Med Trop* 2000; 42(3): 175-177.
- Fernandes JOM, Buzetti WAS. Prevalência de Cisticercose Bovina em animais abatidos em frigoríficos sob Inspeção Federal, da 9ª região administrativa de Araçatuba, SP. *Rev Hig Alimentar* 2001; 15(87): 30-37.
- Gottstein B, Zini D, Schantz PM. Species-specific immunodiagnosis of *Taenia solium* cysticercosis by ELISA and immunoblotting. *Trop Med Parasit* 1987; 38: 299-303.
- Harlow E, Lane D. *Antibodies: A laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory; 1988.
- Harrison LJS, Joshua GWP, Wright SH, Parkhouse RME. Specific detection of circulating surface/secreted glycoproteins of viable cysticerci in *Taenia saginata* cysticercosis. *Parasite Immunol* 1989; 11: 351-370.
- Hayunga EG, Summer MP, Rhoads ML, Murrell KD, Isenstein RS. Development of a serologic assay for cysticercosis, using an antigen isolated from *Taenia spp* cyst fluid. *Am J Vet Res* 1991; 52(3): 462-470.
- Joshua GWP, Harrison LJS, Sewell MMH. Protein antigens in the cyst fluid of *Taenia saginata* cisticerci. *Parasitol* 1990; 100: 463-467.
- Köhler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity *Nature* 1975; 256: 495-497.
- Laemmli VK Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227: 680-684.
- Murrell KD *Guidelines for the Surveillance, Prevention and Control of Taeniosis/Cysticercosis*. WHO/FAO/OIE, Paris; 2005.

- Onyango-Abuje JA, Hughes G, Opicha M, Nginyi KM, Rugutt MK, Wright SH, Harrison LJS. Seroepidemiological survey of *Taenia saginata* cysticercosis in Kenya. *Vet Parasitol* 1996; 64: 177-185.
- Paulan SC, Gonz  les RMH, Peralta LA, Vicentini-Oliveira JC, Biondi GF, Conde ES, Parkhouse RME, Nunes CM. Usefulness of serological ELISA assay for *Taenia saginata* to detect naturally infected bovines. *Rev Bras Parasitol Vet* 2013; 22(2): 270-275.
- Tsang VCW, Brand JA, Boyer AE. An enzyme-linked immunoelectrotransfer blot assay and glycoprotein antigens for diagnosing human cysticercosis (*Taenia solium*). *J Infec Dis* 1989; 159: 50-59.
- Van Kerckhoven I, Vansteenkiste W, Claes M, Geerts S, Brandt J. Improved detection of circulating antigen in cattle infected with *Taenia saginata* metacestodes. *Vet Parasitol* 1998; 76: 269-274.
- Vicentini-Oliveira JC, Golim MA, Paulan SC, Biondi GF, Rossi-Ferreira R, Deffune E, Nunes CM. *Taenia saginata*: Production and characterization of monoclonal antibodies against *Taenia saginata* metacestode antigens. *Exp Parasitol* 2010; 126: 621-625.
- Yang HJ, Chung JY, Yun DH, Kong Y, Ito A, Ma L, Liu Y. Immunoblot analysis of a 10kDa antigen in cyst fluid of *Taenia solium* metacestodes. *Parasite Immunol* 1998; 20: 483-488.

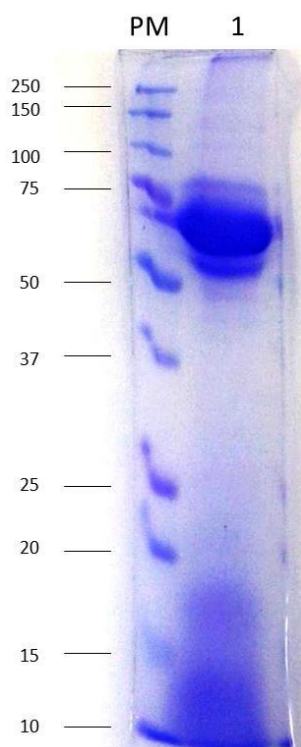
Figuras

Figura 1. Eletroforese SDS-PAGE a 12% de antígenos de excreção/secreção de *Taenia saginata* corado por azul de coomassie. (PM) = padrão de peso molecular (161-0374, BioRad®).

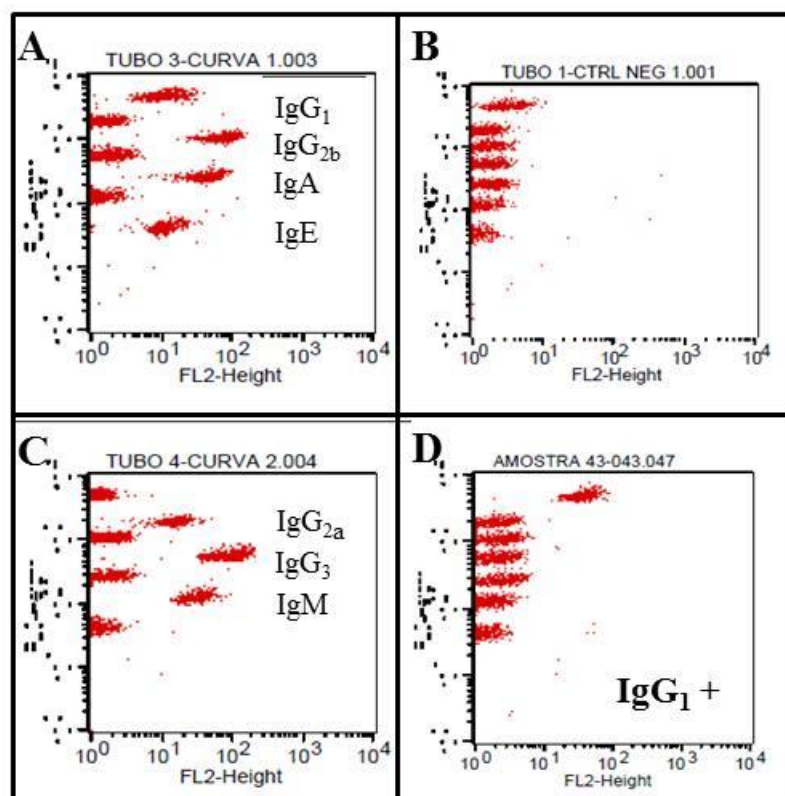


Figura 2. Determinação de classe e subclasse de imunoglobulinas murinas por citometria de fluxo. Em **A** – controles positivos (IgG_1 , IgG_{2b} , IgA , IgE), em **B** – controle negativo, em **C** – controles positivos (IgG_{2a} , IgG_3 , IgM), em **D** – MAb TAES, identificado como IgG_1 .

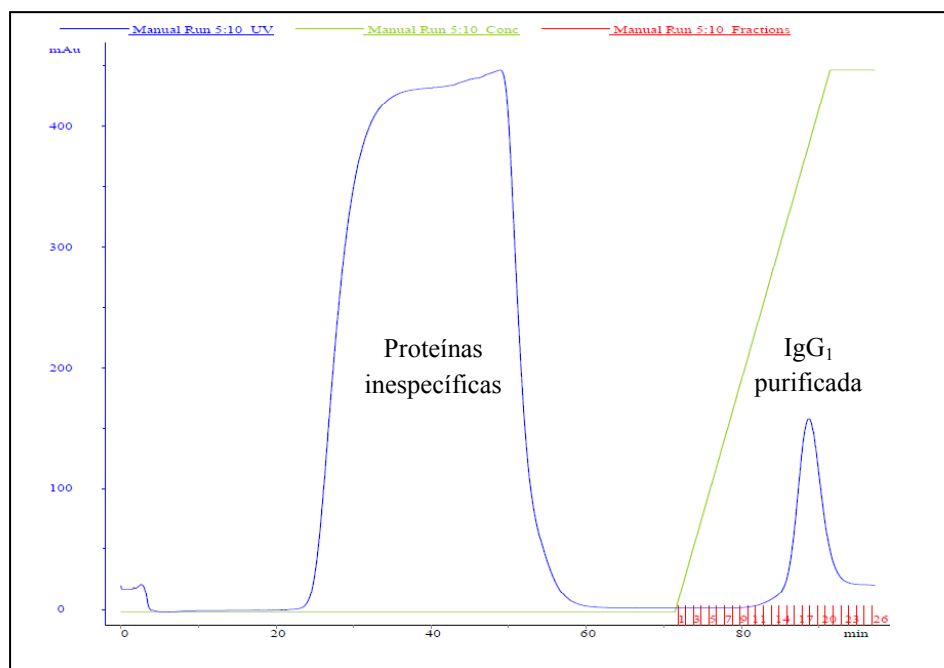


Figura 3. Purificação do anticorpo monoclonal TAES1, classe/subclasse IgG₁ (AKTA Prime[®]).

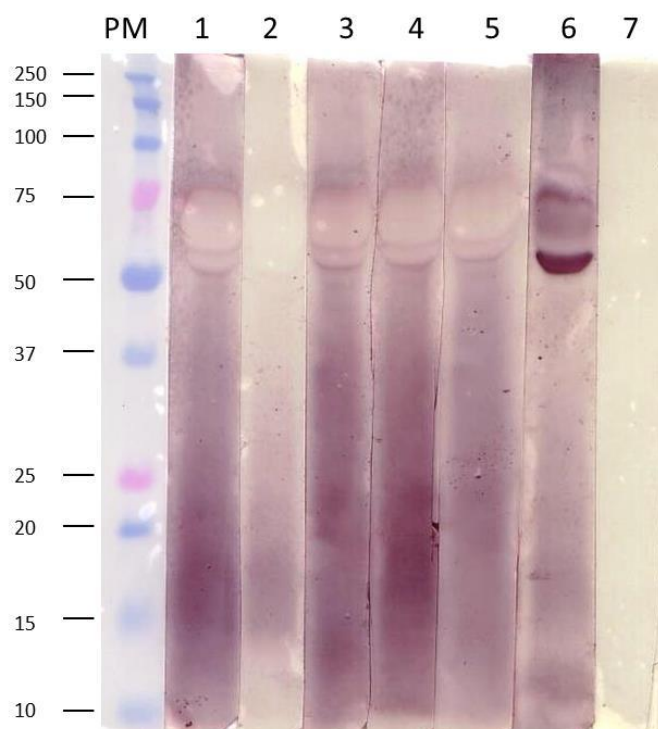


Figura 4. *Western blotting* de antígeno E/S de *T. saginata*. Sobrenadante de cultura (SNC) do anticorpo monoclonal (MAb) TAES1 (1), MAb TAES1 purificado (2), SNC MAb TAES2 (3), SNC MAb TAES3 (4), SNC MAb TAES4 (5), soro de camundongo pós-imunização – controle positivo (6), soro de camundongo pré-imunização - controle negativo (7). (PM) = padrão de peso molecular (161-0374, BioRad®).

VICENTINI-OLIVEIRA, J.C. **Produção de anticorpos monoclonais contra antígenos de excreção/secreção de metacestódeos de *Taenia saginata***. Botucatu, 2014. 13p. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

Resumo

A cisticercose bovina é a principal causa de perdas econômicas na cadeia produtiva da carne devido à condenação de carcaças no abate. A inspeção sanitária nos matadouros é insuficiente para detectar animais com baixa carga parasitária. Neste estudo foram produzidos anticorpos monoclonais contra antígenos de excreção/secreção (E/S) de metacestódeos de *Taenia saginata* em camundongos BALB/c imunizados. Após a fusão celular com mielomas NS1, 5 híbridos (TAES) foram selecionados e clonados, resultando em 88 clones TAES IgG₁. Os sobrenadantes de cultura testados identificam frações antigênicas de baixo peso molecular (<20 kDa), revelando seu potencial como ferramenta em imunoenaios para o diagnóstico da cisticercose.

Palavras-chave: *Taenia saginata*, cisticercose bovina, anticorpo monoclonal, antígeno de excreção/secreção

VICENTINI-OLIVEIRA, J.C. **Production of monoclonal antibodies against *Taenia saginata* metacestode excretory/secretory antigens.** Botucatu, 2014. 13p. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

Abstract

Bovine cysticercosis is a major cause of economic losses in the meat production chain to carcass condemnation at slaughter. Sanitary inspection at slaughterhouses is insufficient to detect animals with low worm burden. In this study we produced monoclonal antibodies against excretory/secretory (E/S) *Taenia saginata* metacestode antigens using immunized BALB/c mice. After cell fusion with NS1 myelomas, 5 hybrids (TAES) were selected and cloned resulting in 88 IgG₁ TAES clones. The culture supernatants tested reacted to low molecular weight (<20kDa) protein fractions, revealing its potential as tool in immunoassays for cysticercosis diagnosis.

Keywords: *Taenia saginata*, bovine cysticercosis, monoclonal antibody, excretory/secretory antigen.

CAPÍTULO 4

CAPÍTULO 4

DISCUSSÃO GERAL

A cisticercose bovina, zoonose de impacto regular na saúde pública, mas causadora de muitos prejuízos financeiros à pecuária de corte bovina, é uma enfermidade cosmopolita. O diagnóstico de rotina é realizado no momento da inspeção das carcaças, mas apresenta sensibilidade limitada em animais com baixa carga parasitária (HARRISON et al., 1989; DRAELANTS et al., 1995; DORNY et al., 2000).

A detecção de antígenos circulantes em bovinos com cisticercose pela técnica de ELISA sanduíche (Ag-ELISA) baseada no uso de anticorpos monoclonais (MAbs) vem sendo utilizada no diagnóstico de infecção ativa nas últimas décadas, demonstrando ser mais sensível que a inspeção visual. Entretanto, a sensibilidade do teste é reduzida em animais com infecção natural e pouco parasitados (HARRISON et al., 1989; BRANDT et al., 1992; ONYANGO-ABUJE et al., 1996; VAN KERCKHOVEN et al., 1998; DORNY et al., 2000; PAULAN et al., 2013). Sendo essa a principal característica do rebanho bovino de corte brasileiro infectado pela *T. saginata*, faz-se necessário buscar alternativas para o diagnóstico rápido e sensível para esse grupo de animais.

Visto que os anticorpos monoclonais apresentam-se como importantes ferramentas terapêuticas e diagnósticas devido à especificidade de ligação a determinado epítipo, homogeneidade e capacidade de produção em grandes volumes (HARLOW; LANE, 1988), o presente trabalho inicialmente objetivou a produção de MAbs. O antígeno utilizado para imunização dos camundongos foi obtido do produto de excreção e secreção de metacestódeos de *Taenia saginata* mantidos em cultura *in vitro*, em decorrência do objetivo do diagnóstico: detectar antígenos circulantes no soro de bovinos que foram excretados ou secretados pelos metacestódeos presentes na musculatura do animal naturalmente infectado.

O diagnóstico de diferentes enfermidades através do uso de imunossensores vem sendo estudado, tendo muitas pesquisas conseguido êxito observando resultados em curto tempo, de forma rápida e mais barata que os métodos de diagnóstico tradicionais (MORAES et al., 2013). O emprego de anticorpos monoclonais no campo diagnóstico está bastante fundamentado, visto que apresenta alta especificidade de ligação a epítopos antigênicos determinados.

No presente trabalho, desenvolveu-se um imunossensor baseado em um anticorpo monoclonal específico para antígeno total de *T. saginata* para aplicação diagnóstica da cisticercose bovina. As etapas de crescimento do filme contendo fibroína da seda (SF) e anticorpo monoclonal (MAb) TAEB foram realizadas com sucesso, comprovando que a fibroína é um excelente matriz de imobilização para anticorpos. Em decorrência da classe da imunoglobulina utilizada (IgM), o alto peso molecular pode ter prejudicado o crescimento do filme acima de 3 bicamadas (SF3/TAEB3). Entretanto, o aumento no tempo de adsorção da fibroína e do MAb TAEB no preparo de uma bicamada automontada (SF1/TAEB1) foi suficiente para a obtenção de medidas capazes de diferenciar, em sua maioria, animais portadores ou não da cisticercose bovina.

A utilização do sensor contendo dois eletrodos de trabalho foi importante para demonstrar que a resposta obtida no imunossensor através dos voltamogramas cíclicos é específica e determinada pela interação entre MAb TAEB imobilizado na superfície do eletrodo e o antígeno circulante presente nas amostras de soro positivas.

Os imunossensores produzidos foram capazes de detectar de 0,1 a 5,0µg/mL de antígeno de E/S de *T. saginata* em solução salina, tendendo à saturação acima de 1,0µg/mL. Quando testaram-se as amostras de soro de bovinos negativos e positivos para a cisticercose, a análise dos voltamogramas cíclicos produzidos foi capaz de classificar todos os animais negativos de forma adequada. No entanto, alguns animais portadores de cisticercose seriam classificados como negativos (falso-negativos). Estes resultados se devem às

variações das análises observadas entre eletrodos, visto que foram utilizados eletrodos diferentes para o teste de cada amostra.

Com o objetivo de normalizar os dados das análises, reduzindo a influência da variação entre eletrodos, foram calculados o aumento de corrente (%) e a diferença entre os valores de corrente obtidos em determinado valor de potencial (0,4 V). Para as 11 amostras de soro de bovinos negativos e 12 de soro de bovinos positivos, o teste obteve 67% de sensibilidade e 91% de especificidade, na análise de porcentagem de aumento da corrente. Já para a análise da diferença entre os valores de corrente o teste apresentou 83% de sensibilidade e 100% de especificidade. Em virtude desses resultados, submeteu-se à Agência UNESP de Inovação (AUIN) um comunicado de inovação para o protótipo de imunossensor no diagnóstico da cisticercose bovina produzido, para análise de pedido de patente.

Apesar do pequeno número de amostras analisado, estes resultados são semelhantes aos obtidos por outros pesquisadores que utilizaram Ag-ELISA para diagnóstico de antígenos circulantes em bovinos (HARRISON et al., 1989; BRANDT et al., 1992; MINOZZO et al., 2004; MONTEIRO et al., 2006; OGUNREMI; BENJAMIN, 2010).

Com relação à produção de anticorpos monoclonais, após imunização dos animais e esplenectomia, os linfócitos B recuperados foram fusionados a células de mieloma múltiplo murino para a produção de células híbridas (hibridomas), capazes de se dividir indefinidamente em cultura celular e produzir anticorpos de interesse (HARLOW; LANE, 1988). Foram obtidos 748 células híbridas que, ao final de 4 testes de triagem por ELISA indireto, para verificação da manutenção da especificidade das imunoglobulinas produzidas ao antígeno, reduziram-se a 5 hibridomas denominados TAES.

Os hibridomas com melhor reatividade ao teste ELISA indireto foram clonados, obtendo-se, ao final das triagens por ELISA indireto, o total de 88 clones TAES. A determinação de classe e subclasse das imunoglobulinas

produzidas mostrou que todos os MAbs são IgG₁, como objetivado no trabalho, visto que as IgGs são consideradas mais estáveis que as IgMs e conjugadas a enzimas com maior facilidade. A substituição de MAbs da classe IgM em teste Ag-ELISA (BRANDT et al., 1992) por outros da classe IgG resultou em aumento de sensibilidade e especificidade na detecção de animais com cisticercose por infecção experimental (VAN KERCKHOVEN et al., 1998).

Os sobrenadantes dos MAbs TAES produzidos reconheceram frações antigênicas de baixo peso molecular (10-20kDa) ao *Western blotting*, consideradas imunogênicas (HARRISON et al., 1989; JOSHUA et al., 1990). O mesmo foi observado por outros autores, que consideram as proteínas de peso molecular inferior a 20kDa imunodominantes nas cisticercoses em antígenos de *T. solium* (GOTTSTEIN et al., 1987; TSANG et al., 1989; YANG et al., 1998) e *T. crassiceps* (ESPÍNDOLA et al., 2000).

Os anticorpos monoclonais produzidos nesta pesquisa deverão ser melhor caracterizados e testados por ELISA sanduíche quanto à sua aplicabilidade neste tipo de ensaio. Deverão também ser avaliados quanto a seu uso no imunossensor descrito para o diagnóstico da cisticercose bovina, comparando-se os resultados aos já obtidos com o anticorpo monoclonal TAEB.

CONCLUSÕES GERAIS

Neste trabalho, foram preparados e caracterizados filmes nanoestruturados pela técnica *Layer-by-Layer* (LbL) contendo a fibroína da seda como matriz de imobilização para o anticorpo monoclonal (MAb) TAEB, produzido contra antígeno total de metacestódeos de *T. saginata*.

O imunossensor produzido a partir desses filmes LbL caracterizados, mostrou que a alteração de corrente observada nas análises eletroquímicas é específica da interação antígeno-anticorpo, tanto em testes realizados com antígeno de excreção/secreção (E/S) de *Taenia saginata*, quanto nas análises de amostras de soro de bovinos parasitados.

Apesar da necessidade em buscar melhorias na produção do imunossensor, visando reduzir a variação entre eletrodos, os resultados até o momento são muito promissores. Os objetivos propostos foram atingidos, visto que o imunossensor produzido possui baixo custo, facilidade de produção e de execução das medidas, e rapidez na obtenção dos resultados, com tempo de resposta entre 5 e 10 minutos. Para garantir a validação do imunossensor como método de diagnóstico rápido da cisticercose bovina, é necessário que sejam realizados novos testes com maior número de amostras de soros de bovinos portadores ou não da cisticercose.

Outras propostas para melhorar a sensibilidade do imunossensor deverão ser estudadas, como a utilização dos anticorpos monoclonais produzidos contra antígenos E/S de *Taenia saginata* (TAES), que também foram obtidos durante este trabalho. Estes novos anticorpos possibilitam a substituição do MAb de classe IgM utilizado (TAEB) por outro da classe IgG (TAES), e podem ser testados quanto à sua aplicabilidade no teste ELISA sanduíche para a detecção de antígenos circulantes em bovinos com cisticercose.

Após a resposta da Agência UNESP de Inovação (AUIN) quanto ao comunicado de invenção, espera-se que o imunossensor produzido possa ser

aplicado no diagnóstico rápido da cisticercose bovina e avaliado quanto à sua aplicação no diagnóstico de pacientes com neurocisticercose.

Vale ressaltar que esta é a primeira descrição de um imunossensor para o diagnóstico rápido da cisticercose bovina.

BIBLIOGRAFIA

- ABUSEIR, S.; KÜHNE, M.; SCHNEIDER, T.; KLEIN, G.; EPE, C. Evaluation of a serological method for the detection of *Taenia saginata* cysticercosis using serum and meat juice samples. *Parasitol. Res.* v.101, n.1, p. 131-137, 2007.
- ACHA, P.N.; SZYFRES, B. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. 2. ed. Washington, DC: *Organizacion Panamericana de La Salud (OPAS)*. 1989p, Publicação Científica 503, 1986.
- ALEGRET, S. Rigid carbon-polymer biocomposites for electrochemical sensing. A review. *Analyst.* v.121, p.1751-1758, 1996.
- ALFAYA, A.A.S.; KUBOTA, L.T. A utilização de materiais obtidos pelo processo de SOL-GEL na construção de biossensores. *Quím. Nova.* v.25, n.5, p.835-841, 2002.
- ALLEPUZ, A.; NAPP, S.; PICADO, A.; ALBA, A.; PANADES, J.; DOMINGO, M.; CASAL, J. Descriptive and spatial epidemiology of bovine cysticercosis in North-Eastern Spain (Catalonia). *Vet. Parasitol.* v.159, n.1, p.43-48, 2009.
- ALLEPUZ, A.; GABRIËL, S.; DORNY, P.; NAPP, S.; JANSEN, F.; VILAR, M.J.; VIVES, L.; PICART, L.; ORTUÑO, A.; GUTIÉRREZ, J.; CASAL, J. Comparison of bovine cysticercosis prevalence detected by antigen ELISA and visual inspection in the North East of Spain. *Res. Vet. Sci.* v.92, n.3, p.393-395, 2012.
- ALMEIDA, L.P. de; REIS, D. O.; MOREIRA, M. D.; PALMEIRA, S. B. S. Cisticercos em bovinos procedentes de Minas Gerais e abatidos em frigoríficos de Uberlândia - MG, no período de 1997 a 2001. *Revista Higiene Alimentar*, São Paulo, v. 20, n. 139, p. 40-43, 2006.
- ALTMAN, GH; DIAZ, F.; JAKUBA, C.; CALABRO, T.; HORAN, RL; CHEN, J.; LU, H.; RICHMOND, J.; KAPLAN, DL. Silk-based biomaterials. *Biomaterials.* v.24, p.401-416, 2003.
- ARIGA, K.; NAKANISHI, T.; MICHINOBU, T. Immobilization of Biomaterials to Nano-Assembled Films (Self-Assembled Monolayers, Langmuir-Blodgett Films, and *Layer-by-Layer* Assemblies) and Their Related Functions. *J. Nanosci. Nanotechnol.* v.6, n.8, p.2278-2301, 2006.
- BARSAN, M.M.; DAVID, M.; FLORESCU, M.; TUGULEA, L.; BRETT, C.M. A new self-assembled *Layer-by-Layer* glucose biosensor based on chitosan biopolymer entrapped enzyme with nitrogen doped graphene. *Bioelectrochemistry.* v.99, p.46-52, 2014.

- BENITEZ, L.; GARATE, T.; HARRISON, L.J.S.; KIRKHAM, P.; BROOKES, S.M.; PARKHOUSE, R.M.E. Cloning and Sequencing of the gene encoding the principal 18-kDa secreted antigen of activated oncospheres of *Taenia saginata*. *Mol. Biochem. Parasitol.* v.78, p.265-268, 1996.
- BENITEZ, L., HARRISON, L.J.S., PARKHOUSE, R.M.E., GONZALEZ, L.M., GOTTSTEIN, B., GARATE, T. Sequence and immunogenicity of the *Taenia saginata* homologue of the major surface antigen of *Echinococcus* spp. *Parasitol. Res.* v.84, p.426-431, 1998.
- BRANDT, J.; GEERTS, S.; DE DEKEN, R.; KUMAR, V.; CEULEMANS, F.; BRYNS, L.; FALLA, N. A monoclonal antibody based ELISA for the detection of circulating excretory-secretory antigens in *Taenia saginata* cysticercosis. *Int. J. Parasitol.* v.22, p.471-477, 1992.
- BRASIL. Ministério da Agricultura. *Regulamento da inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal - RIISPOA*. Decreto nº 30.691/1952, Brasília: Ministério da Agricultura. 154p, 1952.
- BYRNE, B.; STACK, E.; GILMARTIN, N.; O'KENNEDY, R. Antibody-based sensors: principles, problems and potential for detection of pathogens and associated toxins. *Sensors.* v.9, p.4407-4445, 2009.
- CHENG, Y.; KOH, L-D.; LI, D.; JI, B.; HAN, M-Y.; ZHANG, Y-W. On the strength of β -sheet crystallites of *Bombyx mori* silk fibroin. *J. R. Soc. Interface.* v.11, p.20140305, 2014.
- CHRISTANTE, L. Células Imortais. *Unesp Ciência.* v.18, p.12-17, 2011. Disponível em: <http://www.unesp.br/aci_ses/revista_unespciencia/acervo/18/como-se-faz>. Acesso em 20 out. 2014
- CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. *Indicadores da Agropecuária: Quadro de Suprimentos*. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br/conteudos.php?a=1470&t=2>>. Acesso em 20 out. 2014.
- CRESPILHO, F.N.; ZUCOLOTTO, V.; OLIVEIRA, O.N.Jr.; NART, F.C. Electrochemistry of *Layer-by-Layer* Films: a review. *Electrochemistry Science.* v.1, p.194-214, 2006.
- DECHER, G.; HONG, J.D.; SCHMITT, J. Buildup of ultrathin multilayer films by a self-assembly process: III. Consecutively alternating adsorption of anionic and cationic polyelectrolytes on charged surfaces. *Thin Solid Films.* v.210/211, p.831-835, 1992.

- DORNY, P.; VERCAMMEN, F.; BRANDT, J.; VANSTEENKISTE, W.; BERKVEN, D.; GEERTS, S. Sero-epidemiological study of *Taenia saginata* cysticercosis in Belgian cattle. *Vet. Parasitol.* v.88, p. 43-49, 2000.
- DORNY, P.; PHIRI, I.; GABRIEL, S.; SPEYBROECK, N.; VERCRUYSSSE, J. A sero-epidemiological study of bovine cysticercosis in Zambia. *Vet. Parasitol.* v.104, p.211-215, 2002.
- DORNY, P.; BRANDT, J.; ZOLI, A.; GEERTS, S. Immunodiagnostic tools for human and porcine cysticercosis. *Acta Tropica.* v.87, p.79-86, 2003.
- DORNY, P.; PHIRI, I.K.; VERCRUYSSSE, J.; GABRIEL, S.; WILLINGHAM, A.L.; BRANDT, J.; VICTOR, B.; SPEYBROECK, N.; BERKVEN, D. A Bayesian approach for estimating values for prevalence and diagnostic test characteristics of porcine cysticercosis. *Int. J. Parasitol.* v.34, p.569-576, 2004.
- DORNY, P.; PRAET, N. *Taenia saginata* in Europe. *Vet. Parasitol.* v.149, p.22-24, 2007.
- DRAELANTS, E.; HOFKENS, E.; HARDING, E.; BRANDT, J.; GEERTS, S. Development of a dot-enzyme immunoassay for the detection of circulating antigen in cattle infected with *Taenia saginata* cysticerci. *Res. Vet. Science.* v.58, p.99-100, 1995.
- DUTRA, L.H.; GIROTTO, A.; VIEIRA, R.F.C.; VIEIRA, T.S.W.J.; ZANGIROLAMO, A.F.; MARQUÊS, F.A.C.; HEADLEY, S.A.; VIDOTTO, O. The prevalence and spatial epidemiology of cysticercosis in slaughtered cattle from Brazil. *Semina: Ciências Agrárias.* v.33, n.5, p.1887-1896, 2012.
- EICHENBERGER, R.M.; LEWIS, F.; GABRIEL, S.; DORNY, P.; TORGERSON, P.R.; DEPLAZES, P. Multi-test analysis and model-based estimation of prevalence of *Taenia saginata* cysticercus infection in naturally infected dairy cows in the absence of a „gold standard“ reference test. *Int. J. Parasitol.* v.43, p.853-859, 2013.
- ESPÍNDOLA, N.M.; GASPARI, E.N.; NAKAMURA, P.M.; VAZ, A.J. Production of monoclonal antibodies anti *Taenia-crassiceps* cysticerci with cross-reactivity with *Taenia solium* antigens. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo,* v.42, n.3, p.175-177, 2000.
- FATIBELLO-FILHO, O.; CAPELATO, M.D. Revisão. Biossensores. *Quím. Nova.* v.15, n.1, p.28-39, 1992.
- FERNANDES, J.O.M., BUZETTI W.A.S. Prevalência de Cisticercose Bovina em animais abatidos em frigoríficos sob Inspeção Federal, da 9ª região

- administrativa de Araçatuba, SP. *Rev. Higiene Alimentar*. v.15, n.87, p.30-37, 2001.
- FERRER, E.; BENITEZ, L.; FOSTER-CUEVAS, M.; BRYCE, D.; WAMAE, L.W.; ONYANGO-ABUJE, J.A.; GARATE, T.; HARRISON, L.J.S.; PARKHOUSE, R.M.E. *Taenia saginata* derived syntetic peptides with potential for the diagnosis of bovine cysticercosis. *Vet. Parasitol.* v.111, n.1, p.83-94, 2003.
- FERRER, E.; GONZALEZ, L.M.; MARTINEZ-ESCRIBANO, J.A.; GONZALEZ-BARDERAS, M.E.; CORTEZ, M.M.; DÁVILA, I.; HARRISON, L.J.S.; PARKHOUSE, R.M.E.; GÁRATE, T. Evaluation of recombinant HP6-Tsag, an 18kDa *Taenia saginata* oncospheral adhesion protein, for the diagnosis of cysticercosis. *Parasitol. Res.* v.101, p.517-525, 2007.
- FLISSER, A.; PÉREZ-MONTFORT, R.; LARRALDE, C. The immunology of human and animal cysticercosis: a review. *Bull. World Health Organ.* v.57, n.5, p.839-856, 1979.
- FLISSER, A. Neurocysticercosis in México. *Parasit. Today*. v.4, p.131-136, 1988.
- GEERTS, S.; KUMAR, V.; CEULEMANS, F.; MORTELMANS, J. Serodiagnosis of *Taenia saginata* cysticercosis in experimentally and naturally infected cattle by enzyme linked immunosorbent assay. *Res. Vet. Sci.* v.30, p.288-293, 1981.
- GEMMEL, M.A.; JOHNSTONE, P.D. Experimental epidemiology of hydatidosis and cysticercosis. *Adv. Parasitol.* v.15, p.311-369, 1977.
- GOTTSTEIN, B; ZINI, D.; SCHANTZ, PM. Species-specific immunodiagnosis of *Taenia solium* cysticercosis by ELISA and immunoblotting. *Trop Med Parasitol*, v.38, n.4, p.299-303, 1987.
- HARLOW, E.; LANE, D. *Antibodies: A laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor laboratory, 726, p.1988.
- HARRISON, L.J.S.; JOSHUA, G.W.P.; WRIGHT, S.H.; PARKHOUSE, R.M.E. Specific detection of circulating surface/secreted glycoproteins of viable cysticerci in *Taenia saginata* cysticercosis. *Parasite Immunol.* v.11, p.351-370, 1989.
- HARRISON, L.J.S.; GARATE, T.; BRYCE, D.M.; GONZALEZ, L.M.; FOSTER-CUEVAS, M.; WAMAE, L.W.; ONYANGO-ABUJE, J.A.; PARKHOUSE, R.M.E. Ag-ELISA and PCR for Monitoring the Vaccination of Cattle against *Taenia saginata* Cysticercosis Using an Oncospheral

- Adhesion Protein (HP6) with Surface and Secreted Localization. *Trop. Anim. Health Prod.* v.37, n.2, p.103-120, 2005.
- HAYUNGA, L.J.S.; JOSHUA, G.W.P.; WRIGHT, S.H.; PARKHOUSE, R.M.E. Development of a serologic assay for cysticercosis, using an antigen isolated from *Taenia spp.* cyst fluid. *Am. J. Vet. Res.* v.52, n.3, p.462-470, 1991.
- HUDSON, PJ; SOURIAU, C. Engineered Antibodies. *Nature Medicine.* v.9, n.1, p.129-134, 2003.
- IBGE. *Indicadores IBGE: Estatística da Produção Pecuária.* Março de 2014. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE. 74p., 2014. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/producaoagropecuaria/abate-leite-couro-ovos_201304_publ_completa.pdf>, Acesso em 15 set. 2014.
- JOSHUA, GWP; HARRISON, LJS; SEWELL, MMH. Protein antigens in the cyst fluid of *Taenia saginata* cisticerci. *Parasitol.* v.100, p.463-467, 1990.
- KÖHLER, G; MILSTEIN, C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature.* v.256, p.495-497, 1975.
- KRAJEWSKA, B. Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: a review. *Enzyme and Microbial Technology.* v.35, p.126–139, 2004.
- KYVSGAARD, N.C., ILSOE, B., HENRIKSEN, S.A., NANSEN, P. Distribution of *Taenia saginata* cysts in carcasses of experimentally infected calves and its significance for routine meat inspection. *Res. Vet. Sci.* v.49, p.29-33, 1990.
- LIGHTOWLERS, M.W.; ROLFE, R.; GAUCI, C.G. *Taenia saginata*: Vaccination against Cysticercosis in Cattle with Recombinant Oncosphere Antigens. *Exp. Parasitol.* v.84, p.330-338, 1996.
- LIMA, LR. *Imunossensores à base de filmes nanoestruturados de fibroína da seda – peptídeo antigênico NS5A-1-vanadato de ítrio: európio para detecção de Hepatite C.* 2014. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Araraquara.
- LOPES, W.D.Z.; SANTOS, T.R.; SOARES, V.E.; NUNES, J.L.N.; MENDONÇA, R.P.; de LIMA, R.C.A.; SAKAMOTO, C.A.M.; COSTA, G.H.N.; THOMAZ-SOCCOL, V.; OLIVEIRA, G.P.; COSTA, A.J. Preferential infection sites of *Cysticercus bovis* in cattle experimentally infected with *Taenia saginata* eggs. *Res. Vet. Sci.* v.90, n.1, p.84-88, 2011.
- LOWINSOHN, D.; BERTOTTI, M. Sensores eletroquímicos: considerações sobre mecanismos de funcionamento e aplicações no monitoramento de

- espécies químicas em ambientes microscópicos. *Quím. Nova.* v.29, n.6, p.1318-1325, 2006.
- LVOV, Y.; DECHER, G.; MÖHWALD, H. Assembly, structural characterization, and thermal behavior of *Layer-by-Layer* deposited ultrathin films of poly(vinyl sulfate) and poly(allylamine). *Langmuir.* v.9, p.481-486, 1993.
- MARIANO-DA-SILVA, S.; ROCHA, R.N.; OLIVEIRA, S.L.; NETTO, A.P.C. Prevalência da cisticercose bovina no Estado de Goiás. *Rev. Agrarian.* v.5, n.16, p.187-192, 2012.
- MARQUARDT, W. C.; DEMAREE, R. S.; GRIEVE, R. B. *Parasitology and vector biology.* 2. ed. California, San Diego: Academic Press, 2000.
- MEDEIROS, E.S.; OLIVEIRA, J.E.; CONSOLIN-FILHO, N.; PATERNO, L.G.; MATTOSO, L.H.C. Uso de polímeros condutores em sensores. Parte 2: Aplicações em sensores. *Revista Eletrônica de Materiais e Processos.* v.7, n.3, p.144-158, 2012.
- MINOZZO, J.C.; GUSSO, R.L.F.; CASTRO, E.A.; LAGO, O.; SOCCOL, V.T. Experimental bovine infection with *Taenia saginata* eggs: recovery rates and cysticerci location. *Braz. Arch. Biol. Technol.* v.45, p.451-455, 2002.
- MINOZZO, J.C.; THOMAZ-SOCCOL, V.; OLORTEGUI, C.C.; SOARES, V.E.; COSTA, A.J. Teste imunoenzimático (enzyme-linked immunosorbent assay) para diagnóstico da cisticercose bovina e estudo da cinética da produção de anticorpos contra *Cysticercus bovis*. *Ciência Rural*, Santa Maria. v.34, n.3, p.857-864, 2004.
- MOINA, C.; YBARRA, G. Fundamentals and Applications of Immunosensors. In: *Advances in Immunoassay Technology* CHIU, N.H.L.; CHRISTOPOULOS, T.K., 190pag, 2012, InTech (livro), capítulo 4 -, 65-80.
- MONTEIRO, L.L.; PINTO, P.S.A.; DIAS, F.S. Evaluation of the ELISA test for the antibody detection in cattle naturally and experimentally infected with *Cysticercus bovis*. *Vet. Parasitol.* v.141, p.260-263, 2006.
- MORAES, M.L.; LIMA, L.R.; SILVA, R.R.; CAVICCHIOLI, M.; RIBEIRO, S.J.L. Immunosensor based on immobilization of antigenic peptide NS5A-1 from HCV and silk fibroin in nanostructured films. *Langmuir.* v.29, p.3829-3834, 2013.
- MOREIRA DOS SANTOS, W.L. Ocorrência da cisticercose em bovinos abatidos. *Rev. Nac. da Carne.* v.25, p.28-29, 1998.
- MURRELL, K.D. *Guidelines for the Surveillance, Prevention and Control of Taeniosis/Cysticercosis.* WHO/FAO/OIE, Paris. 2005. 139p,

- NEVES, D. P.; MELO, A.L.; LINARDI, P.M.; VITOR, R.W.A. *Parasitologia Humana*. 9a ed. São Paulo: Atheneu, 1998.
- NOGUEIRA, G.M.; SWISTON, A.J.; BEPPU, M.M.; RUBNER, M.F. *Layer-by-Layer* deposited chitosan/silk fibroin thin films with anisotropic nanofiber alignment. *Langmuir*. v.26, n.11 p.8953-8958, 2010.
- NORTH, JR. Immunosensors: Antibody-based biosensors. *Trends Biotechnol.* v.3, n.7, p.180-186, 1985.
- OGUNREMI, O.; BENJAMIN, J. Development and field evaluation of a new serological test for *Taenia saginata* cysticercosis. *Vet. Parasitol.* v.169, p.93-101, 2010.
- OIE. *Manual for Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2014*. Chapter 2.9.5 – Cysticercosis. Disponível em: <<http://www.oie.int/international-standard-setting/terrestrial-manual/access-online/>>. Acesso em 20 out. 2014.
- ONYANGO-ABUJE, J.A.; HUGHES, G.; OPICHA, M.; NGINYI, K.M.; RUGUTT, M.K.; WRIGHT, S.H.; HARRISON, L.J.S. Diagnosis of *Taenia saginata* cysticercosis in Kenyan cattle by antibody and antigen ELISA. *Vet. Parasitol.* v.61, p.221-230, 1996a.
- ONYANGO-ABUJE, J.A.; NGINYI, J.M.; RUGUTT, M.K.; WRIGHT, S.H.; LUMUMBA, P.; HUGHES, G.; HARRISON, L.J.S. Seroepidemiological survey of *Taenia saginata* cysticercosis in Kenya. *Vet. Parasitol.* v.64, p.177-185, 1996b.
- OPAS. ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD. *Epidemiologia y Control de La Teniasis-Cisticercosis em America Latina*. OPAS. Volume 3, 1994.
- PATERNIO, LG; MATTOSO, LHC; OLIVEIRA Jr, ON. Filmes poliméricos ultrafinos produzidos pela técnica de automontagem: preparação, propriedades e aplicações. *Quím Nova*. v.24, n.2, p.228-235, 2001
- PAULAN, SC; GONZÁLES, RMH; PERALTA, LA; VICENTINI-OLIVEIRA, JC; BIONDI, GF; CONDE, ES; PARKHOUSE, RME; NUNES, CM. Usefulness of serological ELISA assay for *Taenia saginata* to detect naturally infected bovines. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* Jaboticabal. v.22, n.2, p.270-275, 2013.
- PAWLOWSKI, Z. Epidemiology and prevention of *Taenia saginata* infection. In: FLISSER, A., *Cysticercosis: Present State of Knowledge and Perspectives*. Academic Press, New York. p.69-85, 1982.

- PEREIRA, A.C.; SANTOS, A.S.; KUBOTA, L.T. Tendências em modificação de eletrodos amperométricos para aplicações eletroanalíticas. *Quím. Nova*. v.25, p.1012-1021, 2002.
- PEREIRA, M.A.V.C, SCHWANZ, V.S., BARBOSA, C.G. Prevalência da cisticercose em carcaças de bovinos abatidos em matadouros-frigoríficos do Estado do Rio de Janeiro, submetidos ao controle do serviço de inspeção federal (SIF-RJ), no período de 1997 a 2003. *Arq. Inst. Biol.* v. 73, n.1, p.83-87, 2006.
- PROCÓPIO, D.P.; CORONEL, D.A.; LÍRIO, V.S. Competitividade do mercado internacional da carne bovina: uma análise dos mercados brasileiro e australiano. *R. Política Agrícola*. v.2, p.40-51, 2011.
- PUMERA, M.; SANCHEZ, S.; ICHINOSE, I; TANG, J. Electrochemical nanobiosensors. *Sensors and Actuators B: Chemical*. v.123, p.1195-1205, 2007.
- RIBEIRO, N. A. S.; TELLES, E. O.; BALIAN, S. de C. O complexo teníase humana-cisticercose: ainda um sério problema de saúde Pública. *Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia do CRMV-SP*, São Paulo, v. 10, n. 1, p. 20-25, 2012.
- RICARDI, E.S.; COSTA, P.I.; YAMANAKA, H. Imunossensor Amperométrico. *Quím. Nova*. v.25, p.316-320, 2002.
- ROCKWOOD, D.N.; PREDA, R.C. ; YÜCEL, T.; WANG, X.; LOVETT, M.L.; KAPLAN, D.L. Materials fabrication from *Bombyx mori* silk fibroin, *Nature Protocols*. v.6, n.10, p.1612–1631, 2011.
- ROSA, EA; LANZA, SR; ZANETTI, CR; PINTO, AR. Immunophenotyping of classic murine myeloma cell lines used for monoclonal antibody production. *Hybridoma*. v.31, n.1, p.1-6, 2012.
- ROSSI, G.A.M.; GRISÓLIO, A.P.R.; PRATA, L.F.; BÜRGER, K.P.; HOPPE, E.G.L. Situação da cisticercose bovina no Brasil. *Semina: Ciências Agrárias*. v.5, n.2, p.927-938, 2014.
- SANTIN, M.; MOTTA, A.; FREDDI, G.; CANNAS, M. *In vitro* evaluation of the inflammatory potential of the silk fibroin. *J. Biomed. Mater. Res.* v.46, n.3, p. 382-389, 1999.
- SANTIN, M.; PHILLIPS, G. *Biomimetic, bioresponsive, and bioactive materials: an introduction to integrating materials with tissues*. John Wiley

- & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey. Estados Unidos da América. 2012. 233p.
- SCHANTZ, P.; CRUZ, M.; SARTI, E.; PAWLOWSKI, Z.S. La erradicabilidad potencial de la Taeniasis y la Cisticercosis. *Bol. Ofic. Sanit. Panam.* v.116, p.465-469, 1994.
- SMITH, H.J.; SNOWDON, K.E.; FINLAY, R.C. Serological diagnosis of cysticercosis by an enzyme-linked immunosorbent assay in experimentally infected cattle. *Can. J. Vet. Res.* v.55, n.3, p.274-276, 1991.
- SOUZA, VK; PESSÔA-SILVA, MC; MINOZZO, JC; THOMAZ-SOCCOL, V. Bovine cysticercosis prevalence in Parana state, southern of Brazil in animals slaughtered under the SIF 1710. *Semina: Ciências Agrárias*, v.28, n.4, p.675-684, 2007.
- TICIANELLI, E.A.; GONZALEZ, E.L. *Eletroquímica: Princípios e Aplicações*. 2 ed. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, 2005, 235p.
- TSANG, VCW; BRANDT, JA; BOYER, AE. An enzyme-linked immunoelectrotransfer blot assay and glycoprotein antigens for diagnosing human cysticercosis (*Taenia solium*). *J Infec Dis.* v.159, p.50-59, 1989.
- UNGAR, M.L.; GERMANO, P.M.L. Prevalência da cisticercose bovina no Estado de São Paulo (Brasil). *Rev. Saúde Pública.* v.26, n.3, p.167-172, 1992.
- VAN KERCKHOVEN, I.; VANSTEENKISTE, W.; CLAES, M.; GEERTS, S.; BRANDT, J. Improved detection of circulating antigen in cattle infected with *Taenia saginata* metacestodes. *Vet. Parasitol.* v.76, p.269-274, 1998.
- VEPARI, C.; KAPLAN, D.L. Silk as a biomaterial. *Prog. Polym. Sci.* v.32, n.8, p.991-1007, 2007.
- WANZALA, W.; KYULE, N.M.; ZESSIN, K.H.; ONYANGO-ABUJE, A.J.; KANG'ETHE, K.E.; OCHANDA, H.; HARRISON, J.S.L. Evaluation of an antigen-ELISA in the diagnosis of bovine cisticercosis in Kenyan cattle. *Parasitol. Res.* v.100, p.539-548, 2007.
- WANZALA, W.; ONYANGO-ABUJE, J.A.; KANG'ETHE, E.K.; OCHANDA, H.; HARRISON, L.J. Serodiagnosis of bovine cysticercosis by detecting live *Taenia saginata* cysts using a monoclonal antibody-based antigen-ELISA. *J. S. Afr. Vet. Assoc.* v.73, p.201-206, 2002.
- WATERKEYN, J.G., LIGHTOWLERS, M.W., COPPEL, R., COWMAN, A.F. Characterization of the gene family encoding a host-protective antigen of the tapeworm *Taenia ovis*. *Mol. Biochem. Parasitol.* v.73, p.123-131, 1995.

- WHO. *Foodborne disease outbreaks: guidelines for investigation and control*. 2008. 162p.
- WHO. *Taeniasis/ cysticercosis*. Fact sheet N° 376, 2014. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs376/en/>>. Acesso em: 10 out. 2014.
- XIANG, Y; LU, F; JIANG, SP. *Layer-by-Layer* self-assembly in the development of electrochemical energy conversion and storage devices from fuel cells to supercapacitors. *Chem Soc Rev*. v.41, p.7291-7321, 2012.
- YANG, HJ; CHUNG, JY; YUN, DH; KONG, Y; ITO, A; MA, L; LIU, Y. Immunoblot analysis of a 10kDa antigen in cyst fluid of *Taenia solium* metacestodes. *Parasite Immunol*. v.20, p.483-488, 1998.
- YUCEL, T.; LOVETT, M.L.; GIANREGGARIO, R.; COONAHAN, R.; KAPLAN, D.L. Silk fibroin rods for sustained delivery of breast cancer therapeutics. *Biomaterials*. v.35, n.30, p.8613-8620, 2014.
- ZAMPINI, L.M. Cisticercose bovina no Paraná no período de 1982 a 1988. *Rev. Hig. Alimentar*. v.8, n.30, p.24-25, 1994.
- ZHAO, W.; XU, J-J; CHEN, H-Y. Electrochemical biosensors based on *Layer-by-Layer* assemblies. *Electroanalysis*. v.18, n.18, p.1737-1748, 2006.
- ZHOU, C.; CONFALONIERI, F.; MEDINA, N.; ZIVANOVIC, Y.; ESNAULT, C.; YANG, T.; JACQUET, M.; JANIN, J.; DUGHET, M.; PERASSO, R.; LI, Z. Fine organization of *Bombyx mori* fibroin heavy chain gene. *Nucleic Acids Research*. v.28, n.12, p.2413-2419, 2000.

Anexos

ATESTADO

Atesto para os devidos fins, que o Projeto **"Imobilização de anticorpos monoclonais contra antígenos de excreção/secreção de *Taenia saginata* em nanopartículas"**, Protocolo nº 116/2011-CEUA, de **Josy Campanhã Vicentini de Oliveira**, aluna do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, nível Doutorado, desta Faculdade, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) desta Faculdade.

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, em 03 de junho de 2011.



Prof. Ass. Dr. Carlos Roberto Teixeira

Presidente da CEUA da FMVZ, UNESP - Campus de Botucatu

JUSTIFICATIVA PARA ALTERAÇÃO DO TÍTULO DA TESE

A presente tese de doutorado teve seu título alterado de **“Imobilização de anticorpos monoclonais contra antígenos de excreção/secreção de *Taenia saginata* em nanopartículas”** para **“Desenvolvimento de imunossensor baseado na imobilização de anticorpo monoclonal em fibroína da seda para diagnóstico rápido da cisticercose bovina”**, para melhor adequação ao tema desenvolvido e aos resultados obtidos. Não houve alteração nos procedimentos que envolveram o uso de animais de experimentação inicialmente propostos e que foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) desta Faculdade.

EXPERIMENTAL PARASITOLOGY

AUTHOR INFORMATION PACK



Introduction

Experimental Parasitology emphasizes modern approaches to parasitology, including molecular biology and immunology. The journal features original research papers on the physiological, metabolic, immunologic, biochemical, nutritional, and chemotherapeutic aspects of parasites and host-parasite relationships.

Authors of studies on anti-microbial properties of natural substances are strongly encouraged to submit their work to other, more appropriate journals unless the studies have a strong focus on anti-parasitic activity and address the following points:

- the chemical characterization of the compounds likely implicated to a reasonable degree
- controls for the effects of vehicles and solvents
- if an animal model is not investigated or not available, in vitro activity studies that include at least comparative cytotoxicity data using host cells or tissues to show selective anti-parasitic activity at a level that could indicate a realistic prospect for translation.
- some investigation into the potential mode of action or effects on likely molecular targets in parasites



Before You Begin

Ethics in publishing

For information on Ethics in publishing and Ethical guidelines for journal publication see <http://www.elsevier.com/publishingethics> and <http://www.elsevier.com/journal-authors/ethics>.

Conflict of interest

All authors are requested to disclose any actual or potential conflict of interest including any financial, personal or other relationships with other people or organizations within three years of beginning the submitted work that could inappropriately influence, or be perceived to influence, their work. See also <http://www.elsevier.com/conflictsofinterest>. Further information and an example of a Conflict of Interest form can be found at: http://help.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/286/p/7923.

Submission declaration

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis or as an electronic preprint, see <http://www.elsevier.com/postingpolicy>), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere including electronically in the same form, in English or in any other language, without the written consent of the copyright-holder.

Changes to authorship

This policy concerns the addition, deletion, or rearrangement of author names in the authorship of accepted manuscripts:

Before the accepted manuscript is published in an online issue: Requests to add or remove an author, or to rearrange the author names, must be sent to the Journal Manager from the corresponding author of the accepted manuscript and must include: (a) the reason the name should be added or removed, or the author names rearranged and (b) written confirmation (e-mail, fax, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed. Requests that are not sent by the corresponding author will be forwarded by the Journal Manager to the corresponding author, who must follow the procedure as described above. Note that: (1) Journal Managers will inform the Journal Editors of any

such requests and (2) publication of the accepted manuscript in an online issue is suspended until authorship has been agreed.

After the accepted manuscript is published in an online issue: Any requests to add, delete, or rearrange author names in an article published in an online issue will follow the same policies as noted above and result in a corrigendum.

Copyright

This journal offers authors a choice in publishing their research: Open access and Subscription.

For subscription articles

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (for more information on this and copyright, see <http://www.elsevier.com/copyright>). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement. Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations (please consult <http://www.elsevier.com/permissions>). If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases: please consult <http://www.elsevier.com/permissions>.

For open access articles

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete an 'Exclusive License Agreement' (for more information see <http://www.elsevier.com/OAauthoragreement>). Permitted reuse of open access articles is determined by the author's choice of user license (see <http://www.elsevier.com/openaccesslicenses>).

Retained author rights

As an author you (or your employer or institution) retain certain rights. For more information on author rights for:

Subscription articles please see <http://www.elsevier.com/journal-authors/author-rights-and-responsibilities>.

Open access articles please see <http://www.elsevier.com/OAauthoragreement>.

Role of the funding source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated.

Funding body agreements and policies

Elsevier has established agreements and developed policies to allow authors whose articles appear in journals published by Elsevier, to comply with potential manuscript archiving requirements as specified as conditions of their grant awards. To learn more about existing agreements and policies please visit <http://www.elsevier.com/fundingbodies>.

Open access

This journal offers authors a choice in publishing their research:

Open access

- Articles are freely available to both subscribers and the wider public with permitted reuse
- An open access publication fee is payable by authors or their research funder

Subscription

- Articles are made available to subscribers as well as developing countries and patient groups through our access programs (<http://www.elsevier.com/access>)
- No open access publication fee

All articles published open access will be immediately and permanently free for everyone to read and download. Permitted reuse is defined by your choice of one of the following Creative Commons user licenses:

Creative Commons Attribution (CC BY): lets others distribute and copy the article, to create extracts, abstracts, and other revised versions, adaptations or derivative works of or from an article (such as a translation), to include in a collective work (such as an anthology), to text or data mine the article, even for commercial purposes, as long as they credit the author(s), do not represent the author as endorsing their adaptation of the article, and do not modify the article in such a way as to damage the author's honor or reputation.

Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike (CC BY-NC-SA): for non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, to create extracts, abstracts and other revised versions, adaptations or derivative works of or from an article (such as a translation), to include in a collective work (such as an anthology), to text and data mine the article, as long as they credit the author(s), do not represent the author as endorsing their adaptation of the article, do not modify the article in such a way as to damage the author's honor or reputation, and license their new adaptations or creations under identical terms (CC BY-NC-SA).

Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs (CC BY-NC-ND): for non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, and to include in a collective work (such as an anthology), as long as they credit the author(s) and provided they do not alter or modify the article.

To provide open access, this journal has a publication fee which needs to be met by the authors or their research funders for each article published open access. Your publication choice will have no effect on the peer review process or acceptance of submitted articles.

The open access publication fee for this journal is **\$2200**, excluding taxes. Learn more about Elsevier's pricing policy: <http://www.elsevier.com/openaccesspricing>.

Language (usage and editing services)

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the English Language Editing service available from Elsevier's WebShop (<http://webshop.elsevier.com/languageediting/>) or visit our customer support site (<http://support.elsevier.com>) for more information.

Submission

Our online submission system guides you stepwise through the process of entering your article details and uploading your files. The system converts your article files to a single PDF file used in the peer-review process. Editable files (e.g., Word, LaTeX) are required to typeset your article for final publication. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, is sent by e-mail.



Preparation

NEW SUBMISSIONS

Submission to this journal proceeds totally online and you will be guided stepwise through the creation and uploading of your files. The system automatically converts your files to a single PDF file, which is used in the peer-review process.

As part of the Your Paper Your Way service, you may choose to submit your manuscript as a single file to be used in the refereeing process. This can be a PDF file or a Word document, in any format or lay-out that can be used by referees to evaluate your manuscript. It should contain high enough quality figures for

refereeing. If you prefer to do so, you may still provide all or some of the source files at the initial submission. Please note that individual figure files larger than 10 MB must be uploaded separately.

References

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct.

Formatting requirements

There are no strict formatting requirements but all manuscripts must contain the essential elements needed to convey your manuscript, for example Abstract, Keywords, Introduction, Materials and Methods, Results, Conclusions, Artwork and Tables with Captions. If your article includes any Videos and/or other Supplementary material, this should be included in your initial submission for peer review purposes. Divide the article into clearly defined sections.

Figures and tables embedded in text

Please ensure the figures and the tables included in the single file are placed next to the relevant text in the manuscript, rather than at the bottom or the top of the file.

REVISED SUBMISSIONS

Use of word processing software

Regardless of the file format of the original submission, at revision you must provide us with an editable file of the entire article. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier: <http://www.elsevier.com/guidepublication>). See also the section on Electronic artwork. To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your word processor.

Article structure

Subdivision - numbered sections

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Material and methods

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

Experimental

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

Theory/calculation

A Theory section should extend, not repeat, the background to the article already dealt with in the Introduction and lay the foundation for further work. In contrast, a Calculation section represents a practical development from a theoretical basis.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

Appendices

If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on. Similarly for tables and figures: Table A.1; Fig. A.1, etc.

Vitae - no photos

Include in the manuscript a short (maximum 100 words) biography of each author, along with a passport-type photograph accompanying the other figures.

Essential title page information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Where the family name may be ambiguous (e.g., a double name), please indicate this clearly. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that phone numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address. Contact details must be kept up to date by the corresponding author.**
- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

Graphical abstract

A Graphical abstract is mandatory for this journal. It should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership online. Authors must provide images that clearly represent the work described in the article. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: please provide an image with a minimum of 531 × 1328 pixels (h × w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5 × 13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. See <http://www.elsevier.com/graphicalabstracts> for examples. Authors can make use of Elsevier's Illustration and Enhancement service to ensure the best presentation of their images also in accordance with all technical requirements: [Illustration Service](#).

Highlights

Highlights are mandatory for this journal. They consist of a short collection of bullet points that convey the core findings of the article and should be submitted in a separate editable file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point). See <http://www.elsevier.com/highlights> for examples.

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Abbreviations

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Database linking

Elsevier encourages authors to connect articles with external databases, giving their readers one-click access to relevant databases that help to build a better understanding of the described research. Please refer to relevant database identifiers using the following format in your article: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN). See <http://www.elsevier.com/databaselinking> for more information and a full list of supported databases.

Math formulae

Please submit math equations as editable text and not as images. Present simple formulae in line with normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y. In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text).

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article. Many word processors build footnotes into the text, and this feature may be used. Should this not be the case, indicate the position of footnotes in the text and present the footnotes themselves separately at the end of the article.

Artwork

Image manipulation

Whilst it is accepted that authors sometimes need to manipulate images for clarity, manipulation for purposes of deception or fraud will be seen as scientific ethical abuse and will be dealt with accordingly. For graphical images, this journal is applying the following policy: no specific feature within an image may be enhanced, obscured, moved, removed, or introduced. Adjustments of brightness, contrast, or color balance are acceptable if and as long as they do not obscure or eliminate any information present in the original. Nonlinear adjustments (e.g. changes to gamma settings) must be disclosed in the figure legend.

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Preferred fonts: Arial (or Helvetica), Times New Roman (or Times), Symbol, Courier.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Indicate per figure if it is a single, 1.5 or 2-column fitting image.
- For Word submissions only, you may still provide figures and their captions, and tables within a single file at the revision stage.
- Please note that individual figure files larger than 10 MB must be provided in separate source files. A detailed guide on electronic artwork is available on our website: <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

Regardless of the application used, when your electronic artwork is finalized, please 'save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings. Embed the font or save the text as 'graphics'.
 TIFF (or JPG): Color or grayscale photographs (halftones): always use a minimum of 300 dpi.
 TIFF (or JPG): Bitmapped line drawings: use a minimum of 1000 dpi.
 TIFF (or JPG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale): a minimum of 500 dpi is required.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); the resolution is too low.
- Supply files that are too low in resolution.
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color online (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color: in print or online only. For further information on the preparation of electronic artwork, please see <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>. Please note: Because of technical complications that can arise by converting color figures to 'gray scale' (for the printed version should you not opt for color in print) please submit in addition usable black and white versions of all the color illustrations.

Illustration services

Elsevier's WebShop (<http://webshop.elsevier.com/illustrationservices>) offers Illustration Services to authors preparing to submit a manuscript but concerned about the quality of the images accompanying their article. Elsevier's expert illustrators can produce scientific, technical and medical-style images, as well as a full range of charts, tables and graphs. Image 'polishing' is also available, where our illustrators take your image(s) and improve them to a professional standard. Please visit the website to find out more.

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Tables

Please submit tables as editable text and not as images. Tables can be placed either next to the relevant text in the article, or on separate page(s) at the end. Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text and place any table notes below the table body. Be sparing in the use of tables and

ensure that the data presented in them do not duplicate results described elsewhere in the article. Please avoid using vertical rules.

References

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

Reference links

Increased discoverability of research and high quality peer review are ensured by online links to the sources cited. In order to allow us to create links to abstracting and indexing services, such as Scopus, CrossRef and PubMed, please ensure that data provided in the references are correct. Please note that incorrect surnames, journal/book titles, publication year and pagination may prevent link creation. When copying references, please be careful as they may already contain errors. Use of the DOI is encouraged.

Web references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

References in a special issue

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

Reference formatting

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct. If you do wish to format the references yourself they should be arranged according to the following examples:

Reference style

Text: All citations in the text should refer to:

1. *Single author:* the author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of publication;
2. *Two authors:* both authors' names and the year of publication;
3. *Three or more authors:* first author's name followed by 'et al.' and the year of publication. Citations may be made directly (or parenthetically). Groups of references should be listed first alphabetically, then chronologically.

Examples: 'as demonstrated (Allan, 2000a, 2000b, 1999; Allan and Jones, 1999). Kramer et al. (2010) have recently shown'

List: References should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters 'a', 'b', 'c', etc., placed after the year of publication.

Examples:

Reference to a journal publication:

Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2010. The art of writing a scientific article. *J. Sci. Commun.* 163, 51–59.

Reference to a book:

Strunk Jr., W., White, E.B., 2000. *The Elements of Style*, fourth ed. Longman, New York.

Reference to a chapter in an edited book:

Mettam, G.R., Adams, L.B., 2009. How to prepare an electronic version of your article, in: Jones, B.S., Smith, R.Z. (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*. E-Publishing Inc., New York, pp. 281–304.

Journal abbreviations source

Journal names should be abbreviated according to the List of Title Word Abbreviations: <http://www.issn.org/services/online-services/access-to-the-ltwa/>.

Video data

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the files in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 50 MB. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our video instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>. Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

AudioSlides

The journal encourages authors to create an AudioSlides presentation with their published article. AudioSlides are brief, webinar-style presentations that are shown next to the online article on ScienceDirect. This gives authors the opportunity to summarize their research in their own words and to help readers understand what the paper is about. More information and examples are available at <http://www.elsevier.com/audioslides>. Authors of this journal will automatically receive an invitation e-mail to create an AudioSlides presentation after acceptance of their paper.

Supplementary data

Elsevier accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please provide the data in one of our recommended file formats. Authors should submit the material in electronic format together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Submission checklist

The following list will be useful during the final checking of an article prior to sending it to the journal for review. Please consult this Guide for Authors for further details of any item.

Ensure that the following items are present:

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address
- Telephone

All necessary files have been uploaded, and contain:

- Keywords
- All figure captions
- All tables (including title, description, footnotes)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell-checked' and 'grammar-checked'
- All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Internet)

Printed version of figures (if applicable) in color or black-and-white

- Indicate clearly whether or not color or black-and-white in print is required.
- For reproduction in black-and-white, please supply black-and-white versions of the figures for printing purposes.

For any further information please visit our customer support site at <http://support.elsevier.com>.

INSTRUCTIONS TO AUTHORS

- [Introduction](#)
- [Editorial Guidelines](#)
- [Ethics](#)
- [Manuscript Preparation](#)
- [Submission of manuscripts](#)

Ethics

Experiments using animals should be conducted following the Brazilian College of Animal Experimentation guidelines (<http://www.cobea.org.br>). Articles should include the protocol number approved by the Animal Ethics Committee.

Manuscript Preparation

The following guidelines should be followed during manuscript preparation:

All articles should be submitted in United States English. Always use concise and impersonal language. Footnotes should be placed at the bottom of the corresponding page and numbered with Arabic numerals in an ascending order. All manuscripts should be typed in Times New Roman font, size 12, page setup with 2.5-cm top and bottom margins, 3-cm left and right margins, and 1.5-cm line spacing. All pages should be numbered. Full Articles should have a maximum of 15 pages and Research Notes should have a maximum of 5 pages in the final layout. All tables and illustrations should be presented separately from the main text body and attached to the final manuscript without captions. The related captions should be included in the text after the References. When submitting your article, please send an e-mail with the deposit slip attached: <http://www.scielo.br/rbpv>. It is the authors' responsibility to make sure that accepted papers are reviewed by one of the English language reviewers certified by RBPV. Full Articles should be structured as follows: **Original Title, Translated**

Title, Author(s), Affiliations, Abstract (Keywords), Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion, Conclusions (or a combination of the last three), **Acknowledgements** (optional), and **References**. Research Notes should follow the same structure as described above but they can be presented as a continuous stream of body text with no need to include headings. Novelty and originality that bring to light new significant findings are expected.

Description of each item of the manuscript title

The full title and subtitle, if any, should not exceed 15 words. The title should not include any abbreviations, and species names and Latin words should be italicized. Titles that start with "Preliminary studies," "Notes about," and the like should be avoided. Do not use the author's name and date of citation in scientific names.

Author(s)/Affiliations

List all authors' full name (with no abbreviations). Affiliations should include the original institution names, not their English translations, in the following order: laboratory, department, college or school, institute, university, city, state and country. Include at the bottom of the page the corresponding author information:

full address, telephone number, and current e-mail.

References

References will only be accepted if they are reader-friendly. References of papers published in conference proceedings will not be accepted and theses only if they are available for consultation at official websites such as the CAPES thesis bank: <http://www.capes.gov.br/servicos/banco-de-teses>. All cited references in the text should be carefully checked for the authors' names and dates exactly as they appear in the reference section.

Abstract

Abstracts are limited to 200 words and should be structured in a single paragraph with no indentation. The abstract should not include references. *Acronyms or abbreviations should be written out in full and the abbreviation given in brackets the first time they are used in abstract*, for example, indirect fluorescence assay (IFA). The abstract should be informative and present the objectives, a brief description of methods, the main results, and a conclusion. All manuscripts written in English should also have the abstract and keywords written in Portuguese.

Keywords

Keywords should accurately reflect the text content. Limited to a maximum of 6 (six).

Introduction

Should have a clear and concise justification of the study including its relevance and objectives and should keep the number of citations to a minimum.

Materials

and

Methods

A concise description including core information for the understanding and reproduction of the study. Well-established methods and techniques should be cited and referenced but not described. Statistical analyses should be described at the end of the section.

Results

The content of this section should be informative rather than interpretative. The results should be accompanied by self-explanatory tables, figures, or other illustrations if necessary.

Discussion

Its content should be interpretative and based on the study results only. The discussion can be a single section or it can be presented together with the results and conclusions. It should emphasize the relevance of new findings and new hypotheses clearly supported by the results.

Tables

Tables must be in editable format (e.g., Excel list format) and supplied in separate files. The word "Table" should precede the table title. Tables should be numbered consecutively with Arabic numerals and have a concise and descriptive title placed above them. They should be typed using double spacing and should have horizontal rules separating the header and the last row. The number of tables in the manuscript should be limited to a minimum.

Figures

Figures consist of drawings, photographs, boards, charts, flow charts, and diagrams and should be supplied in TIF, GIF, or JPG format with a minimum resolution of 300 dpi. They should be numbered consecutively with Arabic numerals and the word "Figure" should precede the legend placed below them. List all numbered legends with their symbols and standard icons in a separate file with double spacing. Figures should be limited to a minimum. Digital pictures should be supplied in separate files. A graphic bar scale instead of a numerical

one should be used in all illustrations, as it can be adjusted with size reduction.

Conclusions

All conclusions may be presented in the Discussion section or in the Results and the Discussion sections when presented together, at the authors' choice. If this is the case, there is no need for a separate Conclusions section.

Acknowledgments

Should be limited to a minimum.

References

References should be listed alphabetically and then sorted chronologically, if necessary. More than one reference by the same author(s) in the same year must be identified by the letters "a," "b," "c," etc., placed after the year of publication. Titles of journals should be abbreviated according to Index Medicus, <http://www2.bg.am.poznan.pl/czasopisma/medicus.php?lang=eng>.

Reference to book
Levine JD. *Veterinary protozoology*. Ames: ISU Press; 1985.

Reference to book chapter
Menzies PI. Abortion in sheep: diagnosis and control. In: Youngquist RS, Threlfall WR. *Current therapy in large animal theriogenology*. 2nd ed. Philadelphia: Saunders; 2007. p. 667-680.

Reference to full article
Paim F, Souza AP, Bellato V, Sartor AA. Selective control of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* in fipronil-treated cattle raised on natural pastures in Lages, State of Santa Catarina, Brazil. *Rev Bras Parasitol Vet* 2011; 20(1): 13-16.

Reference to thesis or dissertation
Araujo MM. *Aspectos ecológicos dos helmintos gastrintestinais de caprinos do município de patos, Paraíba - Brasil* [Dissertação]. Rio de Janeiro: Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro; 2002.

Reference to internet URLs
Centers for Disease Control and Prevention. *Epi Info* [online]. 2002 [cited 2003 Jan 10]. Available from: <http://www.cdc.gov/epiinfo/ei2002.htm>.

Note: In the Reference section, all authors should be listed up to a limit of six authors. If more than six authors, the first six authors should be listed followed by *et al.*

Citations

All citations must follow the author–date system:

One author: author's name and year of publication
Levine (1985) or (LEVINE, 1985)

Two authors: authors' names and year of publication
Paim and Souza (2011) or (PAIM & SOUZA, 2011)

Three or more authors: first author's name followed by *et al.* and year of publication
Araújo *et al.* (2002) or (ARAÚJO *et al.*, 2002)