

DETECÇÃO DO VÍRUS DA CINOMOSE CANINA POR DIFERENTES METODOLOGIAS ANALÍTICAS

CAROLINE RODRIGUES BASSO

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração *Biomoléculas: estrutura e função*.

Prof. Dr. Valber de Albuquerque Pedrosa

**BOTUCATU – SP
2015**



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Campus de Botucatu



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Julio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

DETECÇÃO DO VÍRUS DA CINOMOSE CANINA POR
DIFERENTES METODOLOGIAS ANALÍTICAS

CAROLINE RODRIGUES BASSO

VALBER DE ALBUQUERQUE PEDROSA

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências,
Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de
Mestre no Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral
e Aplicada, Área de concentração *Biomoléculas: estrutura
e função*.

Prof. Dr. Valber de Albuquerque Pedrosa

**BOTUCATU – SP
2015**

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

Basso, Caroline Rodrigues.

Detecção do vírus da cinomose canina por diferentes metodologias analíticas / Caroline Rodrigues Basso. - Botucatu, 2015

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Valber de Albuquerque Pedrosa
Capes: 20100000

1. Cinomose - Diagnóstico. 2. Cão -Doenças. 3. Análise eletroquímica. 4. Espectroscopia de impedância.

Palavras-chave: Biossensor; Cinomose; Ressonância.

DEDICATÓRIA

Em primeiro lugar a Deus, por ter permitido que tudo isso acontecesse, dando-me saúde e força na conclusão deste trabalho.

À minha família, meus pais Pedro Carlos e Maria Aparecida, por terem acreditado em mim, dando-me incentivo e não medindo esforços para que eu pudesse concluir essa etapa de minha vida. À minha irmã Fernanda, pelo apoio incondicional.

Ao meu namorado Anderson pelo incentivo e paciência, sempre do meu lado me apoiando nas horas mais difíceis.

*“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê”
(Arthur Schopenhauer)*

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof^o Dr. Valber de Albuquerque Pedrosa pela amizade, paciência, ensinamento e incentivo, estando presente em todos os momentos tornando possível a conclusão desta monografia.

Ao Prof^o Dr. João Pessoa Araújo Junior por toda ajuda na parte experimental do trabalho, fornecendo todas as amostras de vírus e anticorpos fundamentais para sua execução.

À Dr^a Claudia, pela ajuda nas interpretações dos dados e na execução deste trabalho.

À Juliane Renata, pela amizade e ajuda em todos os momentos.

Aos colegas do Laboratório de Biomateriais e Técnicas Eletroquímicas, Lucas, Bruno, Naira e Jéssica, pelas risadas, aprendizados e amizade que levarei para o resto da vida.

A todos os professores e funcionários do Departamento de Química e Bioquímica, UNESP- Botucatu, pela amizade.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo auxílio financeiro para realização do projeto (Processo n^o 2012/15666-1).

E a todos que direta ou indiretamente fizeram parte da minha formação, o meu muito obrigada.

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1: Descrição da estrutura do vírus da cinomose canina representando a proteína N do nucleocapsídeo, as proteínas associadas à transcriptase P e L, a proteína matriz de membrana M e as glicoproteínas H e F. 18
- Figura 2: Esquema de funcionamento de um biossensor demonstrando a detecção do analito. Primeiro ocorre à introdução da amostra que se liga ao componente biológico de interesse presente na superfície do transdutor, que tem como função a transformação do sinal biológico em sinal elétrico que será lido pela unidade processadora e transformado em um sinal mensurável para leitura. 22
- Figura 3: Métodos de imobilização de biomoléculas na superfície dos biossensores através de adsorção física, oclusão, ligação covalente e ligação covalente cruzada. 24
- Figura 4: Esquema representativo do funcionamento de um equipamento de Ressonância Plasmônica de Superfície. 26
- Figura 5: Funcionamento da ressonância plasmônica de superfície segundo configuração de Kretschmann. Uma luz polarizada atravessa o meio óptico denso (prisma) alcançando a interface metal/ar e sendo refletida de volta para o meio mais denso e detectada por um conjunto de fotodiodos. 27
- Figura 6: Configuração de Kretschmann para ressonância plasmônica de superfície, sensorgrama apresentando resposta absoluta (RU) em função do tempo. O gráfico demonstra todas as etapas de adsorção e a quantidade de amostra adsorvida na superfície do sensor. 29
- Figura 7: Monitoramento da adsorção de moléculas na superfície do sensor da SPR. A primeira imagem de IR - intensidade de radiação refletida (reflexibilidade) em função do ângulo demonstra a ligação que ocorre na superfície do sensor. A segunda imagem do ângulo SPR/ mDA- milgraus em função do tempo é usada para monitorar as cinéticas de adsorção de todo processo. 30
- Figura 8: Sensorgrama mostrando as etapas de modificações que ocorrem na superfície do sensor. Primeiro o tampão é passado para formar a linha base, seguido pela adsorção do material de interesse. Novamente o tampão é passado sobre a superfície para remover o material fracamente ligado. A regeneração da superfície é realizada utilizando solução glicina. 31
- Figura 9: Representação da ligação do vírus CDV ao anticorpo que está ligado as nanopartículas modificadas por EDC/NHS e monocamadas auto-organizadas. 40
- Figura 10: Sensorgrama mostrando os passos experimentais: modificação da superfície com EDC/NHS, anticorpo e BSA. ↓ setas indicam o início do passo de lavagem com tampão PBS 10 mM (pH 7,4) contendo 0,1% de Tween 20. 42
- Figura 11: Adsorção e ligação dos anticorpos sobre a superfície do sensor em diferentes concentrações: A) 0,25, B) 0,5, C) 1,0, D) 2,0 E) 10,0, F) e 20,0 L) 50,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ em 10 mM PBS. 43
- Figura 12: Resposta do sensor SPR para a interação de diferentes concentrações de antígenos com os anticorpos imobilizados. A) (a) 1,1, (b) 2,3, (c) 5,8, (d), 11,0 e (e) 116,0 $\mu\text{g L}^{-1}$. O experimento foi realizado na temperatura ambiente em PBS 10 mM, pH 7,4 e após a injeção

de cada amostra a linha de base foi restaurada por injeção de 0,2 M de glicina-HCl (pH 3,0).
B) Fit linear da concentração do CDV realizado em triplicata..... 44

Figura 13: Gráfico de espectroscopia da modificação no eletrodo de ouro MUA (a), ativação EDC/NHS (b), imobilização de anticorpos (c), bloqueio com BSA (d) e ligação do CDV (e) em potencial de 0,3 Vvs. Ag/AgCl em 10 mM PBS (pH 7,4) contendo 10 mM de FCMA. ... 45

Figura 14: A) Espectro de impedância medido para o anticorpo funcionalizado exposto ao eletrodo com CVD em 1 ng mL (a), 3 ng mL (b), 6 ng mL (c), 13 ng mL (d), 115 ng mL e (f) 160 ng mL. B) Curva de calibração R_{CT} no imunossensores compreendendo tanto amostra positiva (●) e controle negativo (●)..... 46

Figura 15: Sensorgrama mostrando o procedimento experimental no biossensor: (A) imobilização de 200 μ L de EDC/NHS sobre as SAMs para criar ligações covalentes com as amins dos anticorpos; (B) injeção de 50 μ L de anticorpos; (C) 100 μ L de BSA necessário para bloquear os espaços remanescentes entre os anticorpos. Setas para baixo (em vermelho) indicam as etapas de lavagem utilizando PBS/tween. Inserção na figura: o gráfico mostra a amostra positiva (linha vermelha) e o experimento de controle negativo (linha preta). 48

Figura 16: Sensorgrama mostrando a ligação dos anticorpos na superfície do sensor guiado pela utilização da proteína A: (A) imobilização de 200 μ L de EDC/NHS; (B) imobilização de 30 μ L da proteína A; (C) 50 μ L de anticorpos foram adicionados para ligação à proteína A e (D) injeção de 100 μ L de BSA. Setas para baixo (em vermelho) indicam as etapas de lavagem utilizando PBS/tween. 49

Figura 17: Gráfico final de detecção do CDV obtido pela técnica de SPR. (A) Ativação com EDC/NHS; (B) injeção da proteína A; (C) injeção dos anticorpos; (D) adição da solução de BSA; (E) ligação da amostra positiva; (F) regeneração da superfície com solução glicina pH 2,5 e (G) controle utilizando amostra negativa. As setas em vermelho indicam lavagem com tampão PBS/tween..... 50

Figura 18: Sensorgrama mostrando o processo de regeneração da superfície para injeção de novas amostras. (A, C e G) injeção de 50 μ L de amostras positivas diferentes; (B, D e F) injeção de 200 μ L de glicina (passo de regeneração) e (E) 50 μ L da amostra negativa (experimento controle). As setas para baixo (em vermelho) indicam as etapas de lavagem utilizando PBS/tween. 50

Figura 19: Gráfico com deslocamento das linhas da SPR demonstrando todo processo de ligação. Modificação da superfície com MUA e EDC/NHS (linha vermelha), injeção da proteína A (linha azul), injeção do anticorpo (linha preta) e injeção da amostra positiva (linha verde). 51

Figura 20: Resposta SPR (RU) versus concentração de anticorpo. O gráfico mostra as respostas SPR em que os anticorpos foram reticulados à proteína A..... 52

Figura 21: Curva de calibração para diferentes concentrações do CDV. A superfície foi regenerada após cada injeção de amostra. As barras de erros representam o desvio padrão das respostas em triplicatas. 53

Figura 22: Imagens obtidas no MET. A) nanopartículas de ouro em uma escala de 1 μ m. B) Distribuição das nanopartículas apresentando um diâmetro médio de $26,67 \pm 3,81$ nm e polidispersividade de 14,3% e C) Espectro de UV-Vis das nanopartículas mostrando a absorvância e comprimento de onda de 525 nm..... 55

Figura 23: Curvas do UV-Vis obtidas após cada etapa de conjugação. Nanopartículas de ouro (linha preta), nanopartículas modificadas com MUA (linha vermelha), modificação com EDC/NHS (linha verde) e adição do anticorpo (linha azul).....	56
Figura 24: Estudo comparativo entre as amostras positiva e negativa. A) nanopartículas de ouro (linha preta), MUA (linha vermelha), EDC / NHS (linha verde), anticorpo (linha azul) e amostra de urina positiva (linha rosa). B) nanopartículas de ouro (linha preta), MUA (linha vermelha), EDC / NHS (linha verde), anticorpo (linha azul) e amostra de urina negativa (linha rosa).	57
Figura 25: Etapas de modificação das nanopartículas obtidas por MET. Nanopartículas de ouro (A), nanopartícula isolada e modificada pela formação da SAM e EDC/NHS (B), adsorção do anticorpo (C) e ligação com o vírus CDV (D).	58
Figura 26: Teste colorimétrico para diferentes tipos de vírus. Nanopartículas de ouro (A), modificação com MUA, EDC/NHS e anticorpo (B), amostra positiva do CDV (C) e amostra negativa (D). Teste de interferência: ophidian paramixovírus (OPMV) (1), parvovírus (2), paramixovírus (3) e vírus Newcastle (4).	59
Figura 27: Diluições das concentrações dos anticorpos. A) amostra de anticorpo diluído em 1 mL de 2,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ em 10 mM PBS para 0,0 mL PBS (linha azul), 200,0 mL PBS (linha verde), 500,0 mL PBS (linha vermelha) e 1000,0 mL PBD (linha preta). B) curva de calibração para o IgG. 1mL de IgG x mg mL foram diluídos para 1000, 500, 200 e 0 mL de PBS.	60
Figura 28: Variações das concentrações de CDV. (A) amostra de CDV diluída em 1 mL de 100,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ em 10 mM PBS para 0,0 mL PBS (linha rosa), 20,0 mL PBS (linha preta), 50,0 mL PBS (linha vermelha), 100,0 mL PBS (linha verde) e 150,0 mL PBS (linha azul). (B) curva de calibração para CDV.....	61

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Características dos materiais mais utilizados como elemento de reconhecimento na construção dos biossensores.	23
Tabela 2: Métodos de imobilização de compostos na superfície do sensor com suas vantagens e desvantagens.	25
Tabela 3: Quantidade de vírus detectado em cada amostra de urina (em ng mm ²) para SPR e RNA viral (cópias/μL) para RT-qPCR.	54

LISTA DE ABREVIACÕES

Ag- Prata

AgCl- Cloreto de prata

AuNPs- Nanopartículas de ouro

BSA- Albumina sérica bovina

C- Velocidade da Luz

CDV- Vírus da cinomose canina

DNA- Ácido Desoxirribonucléico

EDC- N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida

EIS- Espectroscopia de impedância eletroquímica

ELISA- Enzyme-linked immunosorbent assay

ϵ_m - Constante dielétrica do metal

ϵ_p - Constante dielétrica do prisma

FcMA- Ácido monocarboxílico ferroceno

K_a - Constante de afinidade

K_{OPS} - Propagação constant das ondas de plasmons de superfície

K_x - Ângulo

$K\Omega$ - Kiloohms

LSPR- Ressonância plasmônica de superfície localizada

MUA- Ácido 11-mercaptopundecanoid

NHS- N-hidroxissuccinimida

Θ - Ângulo de incidência da luz

OPMV- Ophidian paramixovirus

OPS- Ondas de plasmons de superfície

PBS- Tampão fosfato salino

PCR- Reação de cadeia polimérica

R^2 - Coeficiente de determinação

R_{CT} - Resistencia de transferência de carga

R_{et} - Diâmetro do semicírculo

RNA- Ácido ribonucléico

ROI- Região de interesse

RSD- Coeficiente de variação da corrente medida

RT-qPCR- Transcriptase reversa quantitative PCR

RU- Unidades ressonantes

SAM- Monocamada auto-organizada

SNC- Sistema nervoso central

SPR- Ressonância Plasmônica de superfície

TEM- Microscopia eletrônica de transmissão

ω - Frequência angular da luz incidente

SUMÁRIO

RESUMO	14
ABSTRACT	15
1 INTRODUÇÃO.....	16
1.1 Vírus da Cinomose Canina (CDV- Canine Distemper Virus).....	16
1.2 Detecção do Vírus da Cinomose Canina	19
1.3. Biossensor.....	20
1.4 Ressonância Plasmônica de Superfície (SPR).....	26
1.5 Trabalhos utilizando Ressonância Plasmônica de Superfície.....	32
2 OBJETIVO	35
2.1 Objetivos Gerais	35
2.2 Objetivos Específicos	35
3 PARTE EXPERIMENTAL.....	36
3.1 Reagentes Utilizados	36
3.2 Anticorpos	36
3.3 Amostras	37
3.4 Materiais e Equipamentos	37
3.4.1 Ressonância Plasmônica de Superfície (SPR).....	37
3.4.2 Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIS).....	37
3.4.3 Ressonância Plasmônica de Superfície Localizada (LSPR).....	38
3.4.4 Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM)	38
3.5 Procedimentos	38
3.5.1 Limpeza do sensor e preparação das monocamadas auto-organizadas (SAMs)	38
3.5.2 Preparação das nanopartículas de ouro	39
3.5.3 Utilização das nanopartículas de ouro para detecção do CDV utilizando UV-Vis	39
4 RESULTADO E DISCUSSÃO.....	41
4.1 Detecção do Vírus da Cinomose Canina Utilizando Ressonância Plasmônica de Superfície (SPR) e Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIS)	41
4.2 Utilização da proteína A para detecção do CDV utilizando a técnica SPR	47

4.3 Detecção do Vírus da Cinomose Canina Utilizando Ressonância Plasmônica de Superfície Localizada (LSPR).....	54
5 CONCLUSÃO.....	62
REFERÊNCIAS.....	63

RESUMO

O vírus da cinomose canina conhecido como CDV (*canine distemper vírus*), acomete animais de ordem carnívora sendo considerado uma das doenças canina mais difícil de diagnosticar clinicamente, podendo levando à morte cerca de 85% dos cães infectados. Atualmente, existem varias técnicas para o diagnóstico da cinomose canina entre eles se destacam os métodos ELISA, hibridização *in situ*, testes sorológicos, fluorescência e técnica de PCR, porém os mesmos podem apresentar resultados demorados, além de um elevado custo. Nos últimos anos, o desenvolvimento de biossensores vem se apresentando como uma alternativa para a detecção química e bioquímica de diversos compostos, mostrando grande potencial para sua aplicação no diagnóstico clínico. Dessa forma, desenvolvemos uma metodologia analítica para o diagnóstico rápido da cinomose canina em amostras reais, com alta carga viral, utilizando diferentes técnicas como ressonância plasmônica de superfície (SPR), ressonância plasmônica de superfície localizada (LSPR), espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS) e colorimetria.

Palavras-chave: Biossensor, cinomose canina e ressonância plasmônica de superfície.

ABSTRACT

The canine distemper virus known as CDV, affects animals carnivorous order and is considered one of canine diseases more difficult to diagnose clinically, and may leading to the death about 85% of infected dogs. Currently, there are several techniques for the diagnosis of canine distemper among them stands out the ELISA methods, in situ hybridization, serological tests, fluorescence and PCR technique, however they may present lengthy results and a high cost. In recent years, the development of biosensors has been presented as an alternative to chemical and biochemical detection of several compounds showing high potential for application in clinical diagnostics. Thus, we developed an analytical methodology for the rapid diagnosis of canine distemper virus in real samples, with high viral load, using different techniques such as surface plasmon resonance (SPR), located surface plasmon resonance (LSPR), electrochemical impedance spectroscopy (EIS) and colorimetry.

Keywords: Biosensor, canine distemper and surface plasmon resonance.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Vírus da Cinomose Canina (CDV- Canine Distemper Virus)

A cinomose é uma doença infecciosa viral causada por um Morbillivirus da família Paramyxoviridae, subfamília Paramyxovirinae, ordem Mononegavirales bastante resistente ao meio ambiente, que acomete famílias da ordem Carnívora. Esta doença é causada pelo vírus da cinomose canina que afeta principalmente os cães domésticos podendo contaminar outros animais selvagens como tigres, leões, leopardos, guepardos, furões, raposas e dingos (TOZATO, 2014; GREENE; APPEL, 1998). A principal forma de transmissão do CDV é através de contato direto entre animais infectados por suas secreções nasais, orais, urina e também por meio de partículas disseminadas no ar causando o aparecimento dos sintomas clínicos da doença. Após a infecção, os animais excretam o vírus nos fluidos corporais por períodos prolongados (ARNS; SPILKI; ALMEIDA, 2007).

Essa doença altamente infecciosa costuma ser aguda e febril, acometendo o sistema gastrintestinal, o sistema nervoso central (SNC), o sistema respiratório e a pele do animal. Quando acometido o sistema gastrintestinal o aparelho digestivo é predominantemente afetado, ocorrendo inflamação na mucosa do estômago e do intestino, determinando o aparecimento de gastrite e enterite. O animal também apresenta quadros de vômito e diarreia que no início apresenta aspecto seroso tornando-se hemorrágica e purulenta no final (GEBARA et al., 2004). Se a doença afetar o SNC causará inflamação das meninges ocorrendo meningite virótica, além dos sintomas de encefalite como convulsão, contração muscular localizada, andar em círculos, micção e defecação involuntária, somando-se como sinais típicos da doença. O animal afetado também pode apresentar problemas no sistema respiratório, onde sobre a ação do vírus ocorre inflamação dos pulmões determinando o aparecimento de pneumonia, além da inflamação também diagnosticada na faringe e na laringe provocando tosse. A forma mais benigna da doença é apresentada no modo cutâneo onde aparecem na pele do animal vesículas, pústulas e mucosas. Já nos olhos do animal desenvolve-se conjuntivite serosa (CARVALHO et al., 2012; SILVA et al., 2007; BIAZZONO; HAGIWARA; CORRÊA, 2001).

Como mencionado anteriormente, o CDV é um patógeno com altos índices de mortalidade, sua letalidade é inferior apenas à raiva canina. Este vírus é antigenicamente semelhante ao vírus do sarampo e da peste dos pequenos ruminantes. (BARBOSA; PASSOS, 2008; LÚCIO et al., 2014).

O vírion pleomórfico é constituído por um envelope lipoproteico, capsídeo de simetria helicoidal e genoma de RNA fita simples não segmentado de polaridade negativa. A partícula viral tem aproximadamente 150 a 250 nm de diâmetro e é envolta por um envelope lipoproteico derivado da membrana da célula hospedeira (GREENE; APPEL, 1998; MOCHIZUKI et al., 1999). Seis proteínas estruturais são codificadas por seis genes presente no genoma viral, sendo elas: duas glicoproteínas denominadas hemaglutinina (H) e proteína de fusão (F), uma proteína de membrana chamada proteína matriz (M), uma proteína do nucleocapsídeo (N) e duas proteínas associadas à transcriptase (P e L). A proteína M está na matriz do envelope sendo responsável pela sua estabilidade. A glicoproteína H apresenta atividade de hemaglutinação e é a responsável pela fixação do vírus na célula hospedeira, sendo alvo dos anticorpos neutralizantes. Já a glicoproteína F comanda a passagem do vírus para a célula hospedeira por meio da fusão do envelope viral com a membrana celular. A resposta imune humoral específica e celular contra o CDV é induzida através da hemaglutinina H e da nucleoproteína N (LAMB; KOLAKOFSKY, 2001; HARTMANN, 2006; TOZATO, 2014).

A multiplicação viral inicia-se com a adsorção do vírus na célula hospedeira, resultado da junção entre a glicoproteína H com os receptores de membrana celular. No interior da célula, a organela responsável por sintetizar as glicoproteínas H e F é o retículo endoplasmático granuloso. Após sintetizadas, ocorre uma associação com o retículo endoplasmático não granuloso, permitindo a passagem para a membrana celular. A proteína de membrana M interage com as glicoproteínas do envelope e com a proteína N do nucleocapsídeo, tornando-se importante no processo de montagem do vírus (Fig.1) (ANDREWES; PEREIRA; PORTERFIELD, 1989; BUCHEN- OSMOND, 2003; MESSLING et al., 2001).

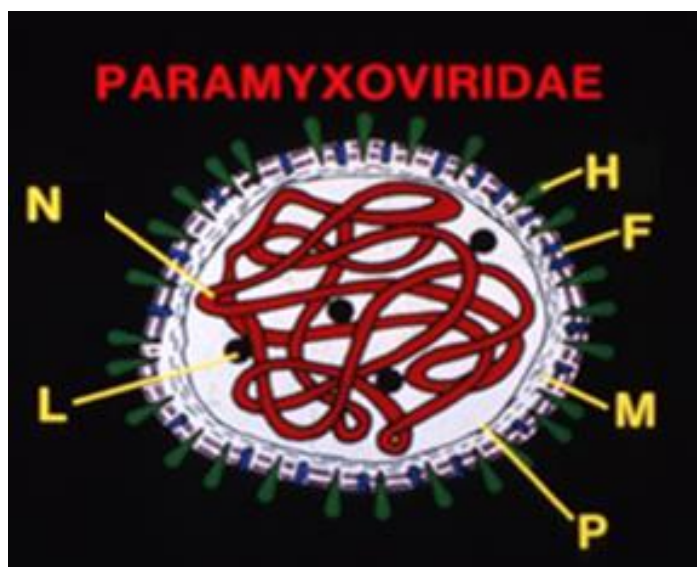


Figura 1: Descrição da estrutura do vírus da cinomose canina representando a proteína N do nucleocapsídeo, as proteínas associadas à transcriptase P e L, a proteína matriz de membrana M e as glicoproteínas H e F.

Fonte: Appel, M.J.G; Summers, B.A. (1999).

O animal ao entrar em contato com o antígeno causador do CDV apenas uma vez irá conferir provavelmente imunidade em longo prazo, pois o mesmo apresenta apenas um sorotipo (MARTELLA et al., 2006). Logo após o contato com o CDV, os cães que se recuperam no início da infecção apresentam maior resposta da reação imune humoral e celular. Os anticorpos produzidos pelo organismo dos cães apareceram entre o décimo e o vigésimo dia depois do contato com o agente causador, atingindo níveis máximos posteriormente. Os dois anticorpos que aparecem logo no início da infecção são o IgG e o IgM, cujo IgG é o mais importante para a imunidade (GRIOT et al., 2001). Em geral, a proteção gerada pela imunidade humoral é devido à produção de anticorpos contra a nucleoproteína N, seguida pela produção de anticorpos contra as proteínas do envelope viral (H e F). A glicoproteína H é o principal antígeno envolvido na neutralização do vírus *in vitro*, entretanto, os anticorpos gerados em resposta à proteína de fusão (F) desempenham importante função para a prevenção da propagação da infecção e desenvolvimento da doença *in vivo* (BEINEKE et al., 2009; LAMB; KOLAKOFSKY, 2001).

A resposta imune mensurada por linfócitos T aparece de dez a quatorze dias após o contato com o antígeno e atinge seu máximo de quatorze a vinte dias. Já a resposta imune humoral irá prevalecer durante anos em animais recuperados. Nos cães que morrem devido à doença, a formação de anticorpos e a resposta imune celular aparecem de forma tardia (SIXT et al., 1998). Logo a vacina é a melhor maneira de impedir que o cão contraia a doença. O vírus também pode ser eliminado com a aplicação nos ambientes de detergentes,

desinfetantes, solventes lipídicos e a altas temperaturas. Nos países em que a cinomose é endêmica, como no Brasil, milhares de cães morrem todo o ano. O controle do CDV é difícil pelo grande número de espécies selvagens que podem ser infectadas. Em países desenvolvidos que reduziram a incidência da doença pela vacinação massiva ainda apresentam surtos esporádicos da cinomose. A infecção pelo CDV se apresenta no mundo inteiro, ocorrendo com maior frequência em cães jovens não vacinados (TOZATO, 2014; ARNS; SPILKI; ALMEIDA, 2007).

1.2 Detecção do Vírus da Cinomose Canina

As altas taxas de mortalidade desta doença infecciosa viral exigem aceleração nos procedimentos de diagnóstico, movendo para a quarentena os indivíduos infectados e iniciando o tratamento adequado precocemente (DASZAK; CUNNINGHAM; HYATT, 2000). O primeiro diagnóstico da cinomose é realizado de acordo com os sintomas clínicos apresentados pelo animal, relacionando sua idade e os sinais visíveis ao veterinário, podendo resultar em um diagnóstico equivocado e errado, pois os sinais clínicos são inespecíficos e outras enfermidades podem apresentar sinais em comum com a cinomose (CORREA; CORREA, 1992). Embora não haja nenhuma terapia específica para a doença, que na maioria das vezes leva o animal à morte, métodos de detecção rápidos e confiáveis são extremamente críticos e essenciais para detectar a presença dos vírus em níveis muito baixos, não apenas para salvar vidas, mas também para poupar tempo de análise e custo (ELIA et al., 2006). Para o diagnóstico laboratorial, o vírus pode ser detectado em uma gama de amostras biológicas nos diferentes estágios da infecção como: urina, sangue total, leucócitos, fezes, saliva e secreção respiratória. Entre essas amostras, a urina tem sido demonstrada por vários autores ser a amostra biológica que apresenta maior vantagem no diagnóstico *ante mortem* devido à alta quantidade viral e o método de colheita não invasivo (AMUDE et al., 2006; AMUDE et al. 2007; KIM et al., 2001; SAITO et al., 2006; TOZATO, 2014).

Nestas amostras biológicas normalmente são utilizadas técnicas de detecção do antígeno ou do RNA viral como: inoculação em cultivo celular, imunofluorescência direta, ELISA direto com anticorpo de captura, imuno-istoquímica, hibridização *in situ*, sorologia e histopatologia (FRISK et al., 1999; RZEZUTKA et al., 2002). Com exceção das técnicas de detecção do RNA viral como reação de cadeia polimérica (PCR), a maioria dessas técnicas apresentam limitações como: baixa sensibilidade analítica ou somente pode ser realizada no *post mortem* (GREENE; VANDEVELDE, 2012; SANTOS et al., 2009). Imunofluorescência

só pode ser realizado em tecido fresco congelado e o teste é mais viável dentro das primeiras três semanas de infecção em doença aguda (JOZWIK; FRYMUS, 2005). A imunohistoquímica é uma técnica altamente sensível e específica para a detecção do vírus CDV em tecidos obtidos *post mortem*, mas possui limitações para o diagnóstico da cinomose em animais vivos, sendo dependente de parâmetros específicos como a produção de anticorpos (SCHMIDT, 1989). A histopatologia não é específica e normalmente requer um teste confirmatório (BEINEKE; SEEHUSEN; BAUMGARTNER, 2009). PCR é uma técnica com elevada sensibilidade analítica, mas esta varia com: tipo de amostra, método de extração do RNA e da escolha dos iniciadores. Contudo, quando comparada com outras técnicas já citadas apresenta algumas vantagens como: a realização de um diagnóstico rápido e precoce (ELIA et al., 2006). No entanto, estes métodos requerem o processamento de vários passos nas amostras de vírus vivo ou de cultura, o que leva a um considerável tempo de análise e custo. Por isso, continua a ser um desafio encontrar novas abordagens que melhoram a rapidez, a simplicidade, a seletividade e a sensibilidade na detecção de doenças infecciosas virais (KATAYAMA; SHIMASAKI; OHGAKI, 2002).

Uma nova ferramenta para a detecção do CDV é através da utilização de biossensores. Nos últimos anos, o desenvolvimento de biossensores vem se apresentando como uma alternativa para a detecção bioquímica de compostos, mostrando grande potencial para sua aplicação em análises de alimentos, clínicas e controle ambiental. Atualmente o desenvolvimento de biossensores se dá pela versatilidade, simplicidade, baixo custo de análise e detecção de compostos dos mais diversos interesses (DAMOS; MENDES; KUBOTA, 2004).

1.3. Biossensor

Nas últimas décadas, a ciência analítica tem alcançado grande possibilidade para obter informações químicas em objetos e sistemas. Como resultado tem sido desenvolvido novas metodologias nas áreas de automação, miniaturização e simplificação de sistemas. Dentre essas áreas estão o desenvolvimento e aprimoramento do uso de sistemas referência, análises qualitativas, expansão dos limites clássicos analíticos e o desenvolvimento de sistemas analíticos como: sensores, biossensores e dispositivos bioanalíticos (OLIVEIRA, 2013). Os biossensores podem proporcionar monitoramento contínuo, *in vivo* e em tempo real, utilizando desse modo menor quantidade de amostra e elevando sua empregabilidade para o mercado comercial. (MALHOTRA; CHAUBEY, 2003).

Um biossensor pode ser definido como um sensor que utiliza um material biológico (enzima, anticorpos, organismo, tecido animal, células, etc.) conectado a um transdutor o qual converte o sinal biológico em sinal elétrico (FATEBELLO- FILHO; CAPELATO, 1992). No início da década de 60, o microbiologista Champ Lyons e o bioquímico Leland C. Clark Jr. desenvolveram o primeiro biossenso. Este biossensor possuía por característica monitorar o oxigênio no sangue através da glicose oxidase acoplado a um eletrodo amperométrico, sendo comercializado em 1972 pela empresa Yellow Springs Instruments (MALHOTRA; CHAUBEY, 2003).

Um biossensor deve ser o mais seletivo quanto possível, sendo ele projetado de acordo com o analito que se pretende determinar. A configuração básica para formação de um biossensor é dada por: um elemento biológico de reconhecimento, um transdutor e por um processador de sinal para a análise dos resultados (HEALY et al., 2007). Uma variedade enorme de amostras pode ser analisada pelos biossensores, podendo variar desde amostras ambientais, alimentares, animais e cultivo de células (GRIESHABER et al., 2008). A descrição sistemática de um biossensor é muito significativa e aborda cinco pontos importantes. Primeiro deve-se saber qual a detecção ou parâmetro de medida; em segundo lugar qual o princípio de funcionamento do transdutor; terceiro qual o modelo que se pretende utilizar, sendo ele químico, físico ou bioquímico; quarto qual a aplicação destinada e em quinto lugar quais serão os materiais e a tecnologia a serem utilizados para a fabricação.

Alguns parâmetros devem ser levados em consideração como: estabilidade, tempo de resposta e sensibilidade para se avaliar as propriedades e qualidade do biossensor. A detecção do analito de interesse é realizada da seguinte maneira: após imobilizar o material biológico junto à superfície do transdutor, este monitora o desaparecimento de algum reagente ou a aparecimento de algum produto da reação do material biológico com o substrato de interesse. Uma das etapas mais importantes para a construção dos biossensores é a escolha do material biológico a ser usado. Pois essa escolha tem que ser de tal forma que a substância a ser analisada reaja seletivamente com a analito (Fig. 2). (OLIVEIRA, 2013; MENDES, 2006). A classificação de um biossensor é dada de acordo com a natureza de seu elemento biológico, pelo seu sistema transdutor ou pela combinação de ambos. Nos últimos anos, avanço científico no sentido de encontrar modificações na superfície de sensores vem sendo realizado para se obter capacidade de interação específica durante um período de tempo prolongado (KASEMO, 2002).

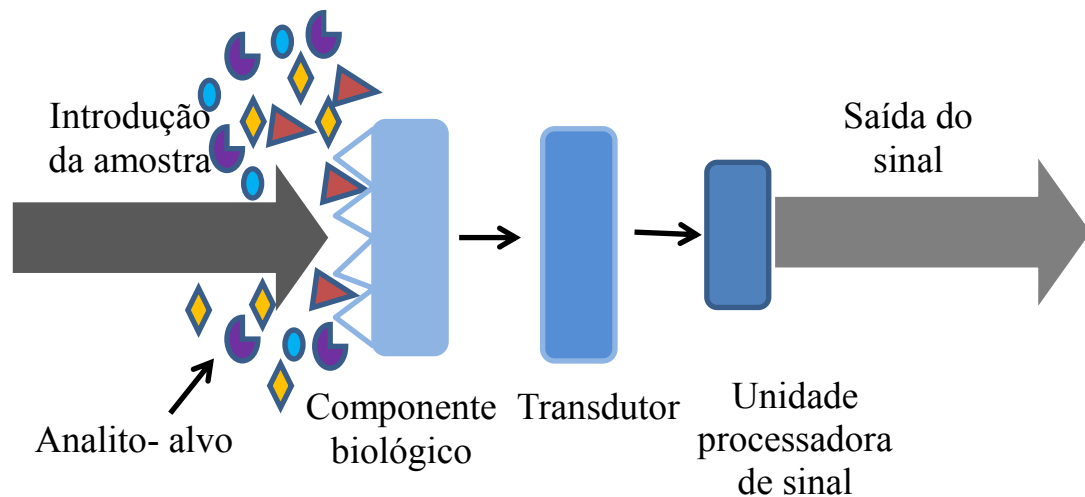


Figura 2: Esquema de funcionamento de um biossensor demonstrando a detecção do analito. Primeiro ocorre à introdução da amostra que se liga ao componente biológico de interesse presente na superfície do transdutor, que tem como função a transformação do sinal biológico em sinal elétrico que será lido pela unidade processadora e transformado em um sinal mensurável para leitura.

Fonte: Oliveira (2013)

Os biossensores podem ser classificados em dois grupos: catalíticos e de afinidade. Nos biossensores catalíticos ocorre uma interação entre o elemento de reconhecimento biológico e o elemento em análise, resultando na conversão de um substrato. Estes elementos de reconhecimento biológicos são principalmente enzimas, organelas, células ou mesmo microorganismos. Já nos biossensores de afinidade, o elemento de reconhecimento biológico liga-se com o elemento em análise, nestes biossensores os elementos biológicos podem ser, por exemplo, o ácido desoxirribonucleico (DNA), anticorpos, células, enzimas, tecidos entre outros. (MENDES, 2006). Entre os elementos de reconhecimento biológicos disponíveis, o uso de anticorpos é o segundo mais utilizado, sobressaindo entre os outros devido à alta taxa de sensibilidade e seletividade apresentada. Os anticorpos se ligam especificamente com o antígeno correspondente, mas na maioria das vezes, sem nenhum efeito catalítico proporcionando uma alta força da ligação que ocorre entre os anticorpos e os antígenos. Nos imunossensores (biossensor baseado na reação imunológica) o anticorpo é imobilizado em uma superfície a qual está conectada ao transdutor, este é responsável por detectar as mudanças físicas ou químicas devido à interação de alta especificidade e seletividade entre o antígeno e o anticorpo e transformá-la num sinal mensurável. A imunoglobulina IgG é o anticorpo mais utilizado em imunoenaios com biossensores (OLIVEIRA, 2013; RICCIARDI; COSTA; YAMANAKA, 2002). A tabela 1 descreve as vantagens e

desvantagens de cada elemento de reconhecimento biológico comumente utilizado na construção dos biossensores.

Tabela 1: Características dos materiais mais utilizados como elemento de reconhecimento na construção dos biossensores.

Elemento de Reconhecimento	Vantagens	Desvantagens
Enzimas	<ul style="list-style-type: none"> - formam complexos estáveis com a espécie de interesse - são bastante seletivas - possuem resposta rápida 	<ul style="list-style-type: none"> - podem perder a atividade após a imobilização - são estáveis por um período relativamente curto de tempo
Anticorpos	<ul style="list-style-type: none"> - são altamente seletivos - são bastante sensíveis - a ligação com o anticorpo é muito estável 	<ul style="list-style-type: none"> - não possuem efeito catalítico - o imuno complexo antígeno-anticorpo formado é irreversível na maioria das vezes
Ácidos Nucléicos	<ul style="list-style-type: none"> - são bastante específicos 	<ul style="list-style-type: none"> - por gerarem baixa resposta, na maioria das vezes, há necessidade do uso de marcadores
Receptores	<ul style="list-style-type: none"> - muito utilizados em análises específicas 	<ul style="list-style-type: none"> - biossensores difíceis de construir - possuem custo muito elevado - são difíceis de isolar

Fonte: Mendes, R.K. (2006)

Para garantir estabilidade e reprodutibilidade na produção de biossensores, é de extrema importância que os elementos de reconhecimento sejam incorporados e permaneçam de maneira estável, preservando sua atividade biológica, sensibilizando-se dessa maneira com o composto alvo. Dentre uma diversidade de técnicas utilizadas para imobilização de biomoléculas nos biossensores destacam-se a adsorção física, ligação covalente, ligação covalente cruzada e método de oclusão (Fig. 3). A escolha da técnica ocorre de acordo com o tipo de transdutor utilizado e para sua aplicação (MENDES, 2006).

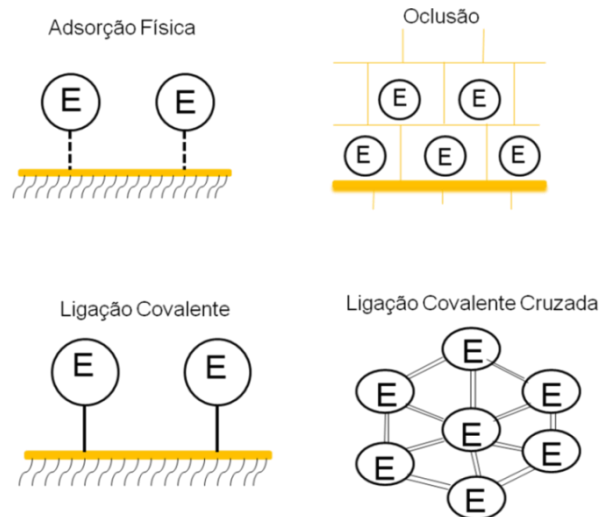


Figura 3: Métodos de imobilização de biomoléculas na superfície dos biossensores através de adsorção física, oclusão, ligação covalente e ligação covalente cruzada.

Fonte: Basso, C.R (2015)

A adsorção física do material na superfície do sensor é explicada por interações hidrofóbicas, ligações de hidrogênio, ligações iônicas ou forças de Van der Waals. A principal vantagem na adsorção física em comparação com os outros métodos é a simplicidade do procedimento, em contrapartida apresenta baixa sensibilidade, estabilidade e reprodutibilidade. Este procedimento consiste basicamente em adicionar o material na superfície do sensor sob condições adequadas de pH e temperatura, em seguida a superfície do sensor é lavada com a finalidade de remover as moléculas que não foram adsorvidas (SANTOS, 2013).

A técnica de ligação covalente é uma das mais utilizadas, pois apresenta maior estabilidade em comparação com as demais. Nessa técnica, ocorre a ligação química de grupos funcionais do material biológico escolhido que não sejam essenciais a sua atividade catalítica. Os sítios ativos das biomoléculas não devem ser afetados pelo processo de ligação covalente, permanecendo assim sua atividade (LOJOU; BIANCO, 2006). O método de imobilização através da ligação covalente cruzada é simples, mas não muito utilizado, pois nessa técnica controlar as condições do experimento mantendo a integridade do elemento biológico é uma tarefa árdua. A ligação covalente cruzada baseia-se nos grupos amino do suporte com os grupos amino das biomoléculas, empregando-se reagente bi ou multifuncionais (CHETCUTI; WONG; STUART, 1999; ZHANG et al., 2004).

Já na técnica de oclusão, o material biológico é confinado na grade de uma matriz polimérica ou em membranas semipermeáveis. As matrizes mais utilizadas são a gelatina, colágeno, triacetato de celulose, poliacrilamida entre outros. A vantagem da utilização desta

técnica é que pode ser aplicada a uma diversidade de material biológico preservando sua atividade. A utilização de outras técnicas de detecção que apresentam alta seletividade e sensibilidade pode ser utilizada em conjunto com os sensores, biossensores e imunossensores como, por exemplo, espectroscopia fotoeletrônica de raios-X, espectrometria de massa e cromatografia entre outras (CARVALHO; RATH; KUBOTA, 2003; MENDES, 2006). A tabela 2 resume as técnicas de imobilização mais utilizadas e compara suas vantagens e desvantagens.

Tabela 2: Métodos de imobilização de compostos na superfície do sensor com suas vantagens e desvantagens.

TIPOS DE IMOBILIZAÇÃO	VANTAGENS	DESVANTAGENS
Adsorção Física	<ul style="list-style-type: none"> - simples - realizado em condições brandas - menos destrutiva para o material biológico 	<ul style="list-style-type: none"> - ligações das biomoléculas são dependentes do pH, solvente e temperatura - alta taxa de lixiviação para a solução, comprometendo a estabilidade do sistema
Ligação Covalente	<ul style="list-style-type: none"> - complexo estável biomolécula-substrato - lixiviação das moléculas é minimizada - maior sensibilidade 	<ul style="list-style-type: none"> - procedimentos mais laboriosos com consumo de tempo - possibilidade de perda da atividade biológica do material
Ligação Covalente Cruzada	<ul style="list-style-type: none"> - procedimento simples - forte ligação química das moléculas 	<ul style="list-style-type: none"> - dificuldade de controle da reação - pode ocorrer falta de rigidez da superfície
Oclusão	<ul style="list-style-type: none"> - podem ser utilizados diversos materiais - preservação da atividade biológica 	<ul style="list-style-type: none"> - o efeito do tamanho dos poros dos materiais pode comprometer a adsorção - perda da biomolécula por lixiviação

Fonte: Mendes, R.K. (2006).

Dentre uma variedade de biossensores disponíveis no mercado, se destaca a produção de biossensores ópticos para determinações de espécies de interesse químico e biológico. Biossensores ópticos baseiam-se na detecção das mudanças de absorção de radiação

eletromagnética na região do visível/infravermelho entre os reagentes e os produtos da reação ou na medição da emissão de luz por um processo luminescente (PATTNAIK, 2005; CARVALHO; RATH; KUBOTA, 2003). Recentemente, biossensores ópticos tem sido amplamente aplicado em diversas áreas tais como: análise patogênica, segurança alimentar, monitoramento ambiental e diagnóstico clínico, entre as quais se destacam as técnicas de espectroscopia, eletroquímica, elipsometria e ressonância plasmônica de superfície. Esforços têm sido feito por diferentes grupos de pesquisa para melhorar a seletividade e sensibilidade dos biossensores ópticos e explorar novos conceitos no modo de transdução (BRECHT; GAUGLITZ, 1995; COUTURE et al., 2013).

1.4 Ressonância Plasmônica de Superfície (SPR)

Após seu lançamento comercial em 1990, a técnica de ressonância plasmônica de superfície (SPR) surgiu como uma ferramenta analítica para utilização em: processos farmacêuticos, controle de qualidade em alimentos, análises clínicas e monitoramento ambiental. Um aumento no número de revisões bibliográficas e livros lidando com o fundamento e aplicação do sensoriamento baseado na SPR tem sido publicada na última década (SCARANO et al., 2010; COUTURE; ZHAOWA; MASSON, 2013).

A técnica de SPR baseia-se nas propriedades ópticas podendo ser empregada para estudos como: fenômenos de superfície, interações proteína-proteína ou proteína-ligante em tempo real e ainda permite a quantificação de interação entre as amostras. Além de permitir o cálculo das cinéticas de interações biomoleculares em tempo real com um alto grau de sensibilidade (CARVALHO; RATH; KUBOTA, 2003) (Fig. 4).

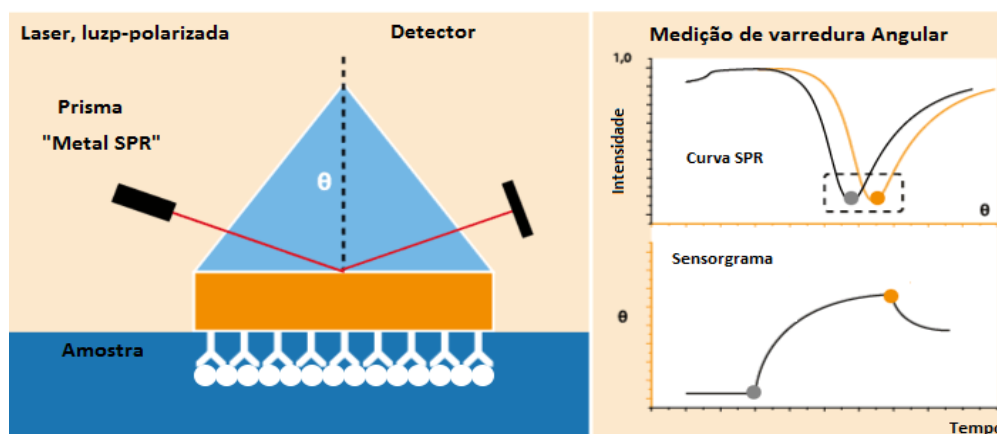


Figura 4: Esquema representativo do funcionamento de um equipamento de Ressonância Plasmônica de Superfície.

Fonte: <http://www.bionavis.com/technologt/spr/> (2014).

A ressonância de plasma de superfície consiste na oscilação da densidade de uma carga longitudinal no decorrer da interconexão entre dois meios com constantes dielétricas de sinais opostos, onde um é o metal e o outro um meio não condutor. Essa técnica pode ser utilizada para se estudar a ligação de uma camada orgânica a superfície do metal que é feita monitorando a medida da mudança do índice de refração devido. Na SPR, a quantificação da espécie de interesse é realizada por medidas do índice de refração e quantidade de luz absorvida. Os metais utilizados são de extrema importância, pois precisam ser bons condutores e possuir propriedades de elétrons livres. Os mais apropriados são o cobre, o alumínio, a prata e o ouro, apesar do alumínio apresentar um custo mais baixo os mais utilizados são o ouro e a prata por serem metais mais nobres. Para que ocorra a agitação do plasma de superfície dois métodos foram criados, um por Otto e outro por Kretschmann (mais utilizado nos equipamentos de SPR, pois apresenta alta sensibilidade e resolução quando comparado ao de Otto) (SCARANO, 2010; PATSKOVSKY et al. 2004).

Na configuração de Kretschmann, a luz que incide é refletida em seu total no interior do prisma, mas uma componente desta radiação ou onda acaba penetrando na interconexão do meio menos denso, atingindo o comprimento de onda de 1λ . Em certo ângulo de incidência, o vetor de onda do plasma se iguala ao vetor de onda do campo, aonde parte desta radiação irá se atrelar com os elétrons livres que oscilam na superfície do filme metálico ocorrendo então o fenômeno de ressonância plasmônica de superfície, mas passa a acontecer também à perda de energia da luz que incide no filme metálico levando a uma redução da luz refletida que será detectada com um arranjo tridimensional de fotodiodos (CARVALHO; RATH; KUBOTA, 2003; SILVA; SILVA; VIANA, 2009) (Fig. 5).

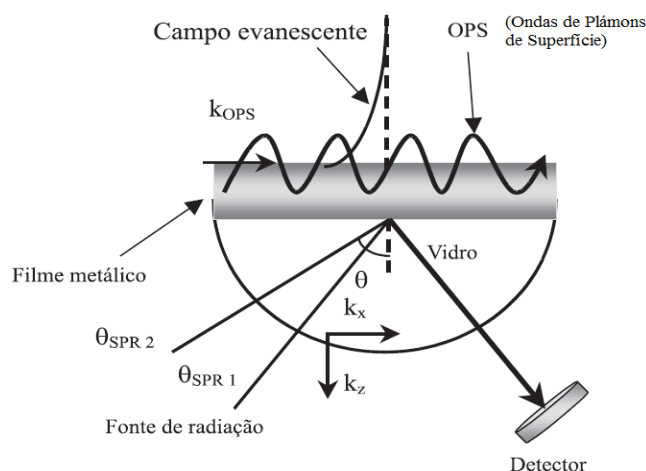


Figura 5: Funcionamento da ressonância plasmônica de superfície segundo configuração de Kretschmann. Uma luz polarizada atravessa o meio óptico denso (prisma) alcançando a interface metal/ar e sendo refletida de volta para o meio mais denso e detectada por um conjunto de fotodiodos.

A parte física de todo processo que ocorre no equipamento, assim como o valor do ângulo (K_x) é exibida na equação abaixo:

Equação 1

$$K_x = \frac{\omega}{c} \sqrt{\epsilon_p \sin \Theta}$$

Onde, Θ é o ângulo incidente da luz com a superfície de metal, ϵ_p é a constante dielétrica do prisma, ω a frequência angular da luz incidente e c a velocidade da luz. Adicionalmente, a propagação constante das OPS (K_{OPS}) em uma interface metal/dielétrico expressa por:

Equação 2

$$K_{OPS} = \frac{\omega}{c} \sqrt{\frac{\epsilon_m \epsilon_p}{(\epsilon_m + \epsilon_p)}}$$

Onde, ω é a frequência angular da onda, c é a velocidade da luz, ϵ_p é a constante dielétrica das espécies que interagem com a superfície e ϵ_m é a constante dielétrica do metal. Assim, é possível o uso do ângulo incidente como parâmetro de controle, para o fenômeno OPS pelo monitoramento da reflectância versus o ângulo incidente. De tal modo, o componente paralelo da luz incidente é equivalente a propagação constante da OPS ($K_x=K_{OPS}$). Desse modo, podemos monitorar o índice de refração na superfície do sensor utilizando a SPR para obter informações sobre velocidade e quantidade de adsorção, permitindo a determinação de propriedades dielétricas, associação, cinética de dissociação e cálculos de afinidade. (DAMOS; MENDES; KUBOTA, 2004; CARVALHO; RATH; KUBOTA, 2003).

Outras duas vantagens de utilizar a SPR é a habilidade para visualizar toda a superfície do sensor em tempo real e mudar a monitorização simultaneamente. Isso é possível por controlar o volume de amostra gotejada na superfície pela ocorrência seletiva da área medida. Diferentes abordagens para medidas têm sido utilizadas para experimentos na SPR baseados

no prisma, incluindo modulação do ângulo, modulação no comprimento de onda e modulação intensiva. SPR detecta mudanças no índice refletido da superfície da camada de uma solução em contato com o sensor. Para estudar a interação entre dois agentes de ligação um primeiro está ligado à superfície e o outro é passado sobre a superfície em fluxo contínuo, a resposta SPR é diretamente proporcional à alteração na concentração da massa perto da superfície (fig. 6). A mudança no sinal da SPR denominada de resposta SPR presente nas unidades ressonantes (RU) está diretamente relacionada com a mudança da concentração de biomoléculas na superfície. Uma resposta da SPR de 120 RU é equivalente a concentração de 1 ng/mm^2 na superfície do sensor (MANUAL AUTOLAB). O limite de detecção da SPR pode monitorar uma espessura de aproximadamente 300 nm acima da superfície do metal, se o índice de refração imediatamente acima da superfície do metal sofre alguma alteração pela adsorção de uma camada de moléculas, seja de qual componente for, uma mudança no ângulo de incidência é requerido para que a excitação do plasma de superfície ocorra. Uma vez que a resposta é uma medida da mudança na concentração de massa, a unidade de resposta por molar de interação é proporcional ao peso molecular (as moléculas menores dão respostas molares inferiores) (SCARANO et al., 2010; D' AGATA; SPOTO, 2013; NAKATANI; SHINSUKE; SAITO, 2001).

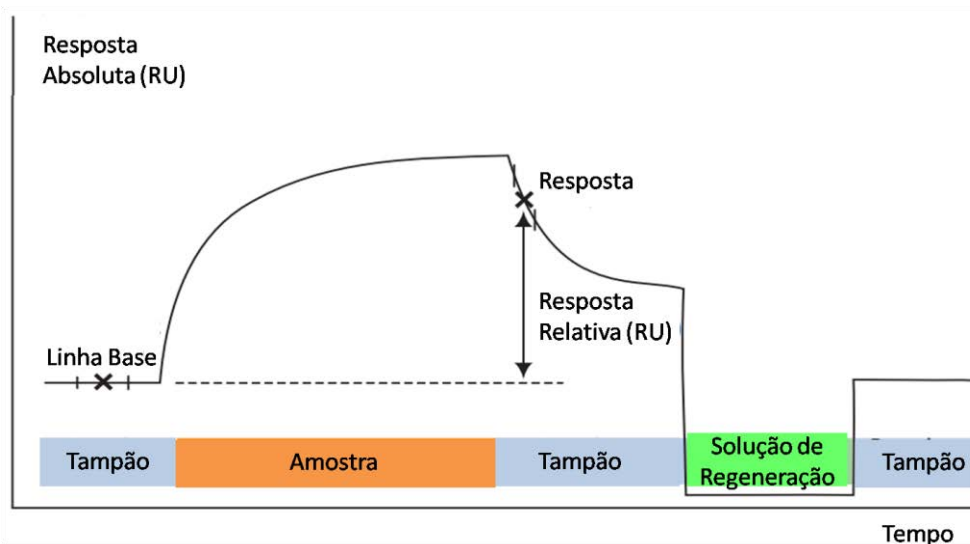


Figura 6: Configuração de Kretschmann para ressonância plasmônica de superfície, sensorgrama apresentando resposta absoluta (RU) em função do tempo. O gráfico demonstra todas as etapas de adsorção e a quantidade de amostra adsorvida na superfície do sensor.

Fonte: Biacore Assay Handbook 29-0194-00 Edition AA. (2012)

A técnica SPR monitora a interação entre duas moléculas, uma das quais está ligada à superfície do sensor e a outra é livre em solução. Para se obter um gráfico de SPR primeiramente uma solução tampão é passada sobre a superfície do metal preparando-o adequadamente para gerar uma linha base sob a curva SPR. Após isso, a primeira solução é colocada sobre o metal onde irá ocorrer o processo de adsorção, essas primeiras moléculas adsorvidas na superfície são chamadas de ligantes e resultam em um aumento do ângulo de ressonância da SPR. Todo esse processo atinge um equilíbrio porque houve uma saturação da superfície do metal com as moléculas. Após essa etapa, uma nova quantidade de tampão é passada novamente sobre a superfície entrando em contato com a solução adsorvida para retirar o material fracamente ligado (Fig. 7) (PATTTNAIK, 2005; OLIVEIRA et al. 2008). O que irá indicar o alcance da adsorção será uma diferença entre o ângulo de ressonância inicial e o final, a velocidade da adsorção será determinada pelo gradiente positivo da curva. O processo de regeneração da superfície do sensor é a remoção do analito detectado que está, por exemplo, ligado a uma proteína adsorvida na superfície, após um ciclo de análise esse analito é removido sem danificar a proteína (Fig. 8).

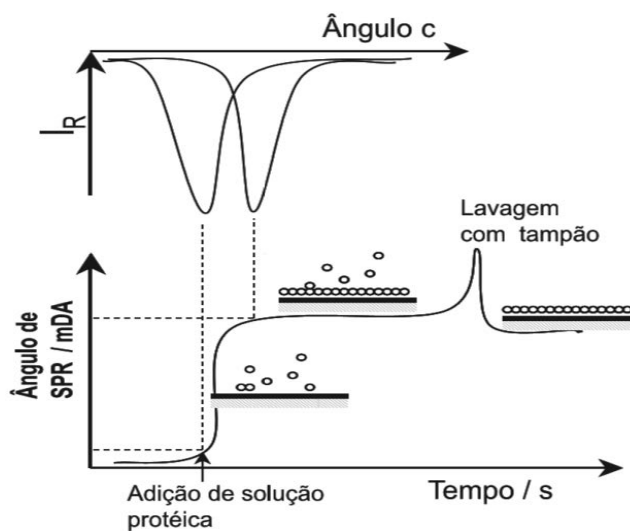


Figura 7: Monitoramento da adsorção de moléculas na superfície do sensor da SPR. A primeira imagem de IR - intensidade de radiação refletida (reflexibilidade) em função do ângulo demonstra a ligação que ocorre na superfície do sensor. A segunda imagem do ângulo SPR/ mDA- miligraus em função do tempo é usada para monitorar as cinéticas de adsorção de todo processo.

Fonte: Carvalho, R.M.; Rath, S.; Kubota, L.T. (2003)

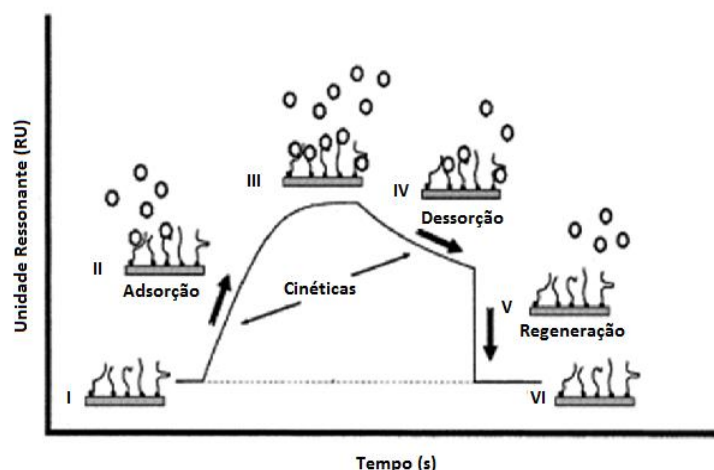


Figura 8: Sensorgrama mostrando as etapas de modificações que ocorrem na superfície do sensor. Primeiro o tampão é passado para formar a linha base, seguido pela adsorção do material de interesse. Novamente o tampão é passado sobre a superfície para remover o material fracamente ligado. A regeneração da superfície é realizada utilizando solução glicina.

Fonte: Biacore Assay Handbook 29-0194-00 Edition AA. (2012)

A técnica de SPR ainda apresenta algumas ramificações, como a ressonância plasmônica de superfície localizada (LSPR). A LSPR é um fenômeno que ocorre quando a frequência do fóton de luz incidente entra em ressonância com os elétrons da banda de condução (elétrons livres) (JENSEN et al., 2000). A diferença entre SPR e LSPR, é que na SPR os elétrons livres da camada de valência presentes na superfície do sensor de ouro entram em ressonância com a luz incidida, vindo a emitir luz, essa emissão ocorre em ambos os eixos x e y da superfície se propagando continuamente. Já na LSPR, essa ressonância fica confinada na superfície das nanopartículas de ouro e a propagação ocorre em apenas um eixo com número de elétrons consideravelmente maior contribuindo para que ocorra o fenômeno de ressonância. Suspensões de nanopartículas de metais nobres como o ouro, interagem fortemente com a luz, dando origem a soluções coloridas. (WILLETS; VAN DUYN, 2007).

A técnica SPR também tem sido utilizada em conjunto com a eletroquímica. Recentes estudos mostram que estudos de reações analito- receptor podem ser realizados em tempo real utilizando ambas metodologias (ZHANG; WRIGHT; YANG, 2000). Técnicas eletroquímicas como voltametria cíclica, espectroscopia de impedância, voltametria de redissolução anódica, entre outras associadas com a SPR promovem análises automáticas e rápidas, podendo ser utilizadas para investigar e monitorar a adsorção de íons, formação e/ou redução de óxidos e adsorção induzida eletroquimicamente. Esses experimentos geralmente são realizados medindo-se através da corrente a velocidade de reação no eletrodo ou observando o efeito físico acumulativo das reações no eletrodo (IWASAKI et al., 1998). Os resultados obtidos

com a SPR e a eletroquímica podem ser apresentados em forma de espectro de transmissão sem refinamento, que consiste em um registro em tempo real da intensidade de radiação transmitida. Também na forma de espectro de transmissão normalizado, que tipicamente é realizado em ar, onde o plasma ressonante não é excitado em um determinado comprimento de onda. E por último, na forma de comprimento de onda de acoplamento, correspondendo ao mínimo de um espectro normalizado. Quando se obtêm essas formas, os gráficos da SPR com eletroquímica são em função da corrente e potencial (CARVALHO; RATH; KUBOTA, 2003).

Logo, os resultados preliminares demonstram que: 1) A plataforma SPR pode ser usada para se estudar as mudanças provocadas por analito; 2) As biomoléculas imobilizadas em monocamadas auto-organizadas ainda conservam suas funções biocatalíticas no ambiente hidrofílico; 3) A utilização SPR para reconhecimento da cinomose canina por anticorpos imobilizados faz-se uma metodologia seletiva e de fácil reconhecimento molecular. Portanto, as tarefas desafiantes desta proposta foram estudar: 1) o acoplamento do processo biocatalítico (reconhecimento molecular) e o desenvolvimento de uma nova plataforma pra SPR, 2) a modificação da superfície da SPR por monocamadas auto-organizadas e 3) detecção seletiva da cinomose canina. Estes dados também foram obtidos pela metodologia de eletroquímica

1.5 Trabalhos utilizando Ressonância Plasmônica de Superfície

É altamente interessante a aplicação da ressonância plasmônica de superfície (SPR) para diversas detecções do pretendido analito, isto porque SPR permite realizar medidas qualitativas e quantitativas de interações biomoleculares em tempo real. Biossensores baseados em SPR são conhecidos por fornecer informações ricas em especificidade, afinidade, cinética de interações biomoleculares e determinar a concentração do analito de interesse em amostras complexas. Além disso, esta nova técnica começa um importante papel em estudos biológicos, pesquisas na área da saúde, descoberta de drogas, diagnóstico clínico e monitoramento do meio ambiente. Medida da mudança do índice de refração da SPR ocorre em consequência da interação amostra-analito, reação proveniente do sinal pode ser correlacionada diretamente com a densidade da massa na superfície do metal. Esta técnica possui habilidade para obter uma imagem da superfície do sensor e definir certas regiões de interesse (ROIs) para medição de muitas interações biomoleculares ao mesmo tempo com referência de controle positivos e negativos para determinar as ligações não específicas ou

reação em tempo real (SOLANKI et al., 2008). No mundo, mais de 80% de todos os artigos publicados utilizando a técnica de SPR estão dirigidos para aplicações na área biológica e clínica, estudando as interações biomoleculares e bioespecíficas. A técnica também vem sendo empregada na área da física em estudos de monocamadas, filmes poliméricos, bicamadas orgânica e na eletroquímica (PATTNAIK, 2005; FANG et al. 2010).

Wang 2012 e seus colaboradores publicaram um trabalho utilizando nanopartículas magnéticas para a detecção da bactéria *Escherichia coli* O157: H7 através da SPR. Nesse trabalho foi relatado que a utilização de nanopartículas magnéticas aumentou a resposta do sensor e se mostrou particularmente atraente para detecção de grandes moléculas. A bactéria *Escherichia coli* pode ser detectada em concentrações menores que 50 ufc mL^{-1} .

Yanase et al. 2014 realizou um estudo empregando a técnica SPR para análise clínica utilizando células. Este estudo visualizou as reações de células individuais e o potencial de aplicação da SPR para detecção de células no diagnóstico clínico, tais como sistemas de diagnóstico e detecção de células malignas em células normais.

Koubová 2001 e seus colaboradores desenvolveram pesquisas na área alimentícia utilizando a técnica de SPR. Em um de seus trabalhos eles detectaram os analitos *Salmonella enteritidis* e *Listeria monocytogenes* através de ligação com anticorpos específicos imobilizados por meio de ligações covalentes na superfície do sensor. *Salmonella* e *Listeria* puderam ser detectadas em concentrações de até 10^6 cell/mL . Os resultados demonstraram um aumento da sensibilidade de detecção para aplicações utilizando a técnica SPR quando comparados com testes ELISA.

Yang et al. 2008 utilizou a técnica da SPR para estudar interações entre RNA-proteína. Ele recobriu a superfície do sensor com Estreptavidina seguida pela adsorção de RNAs, demonstrando que a proteína do nucleocapsídeo (N) da síndrome respiratória aguda grave coronavírus (SARS-CoV) tem uma elevada afinidade de ligação com a sequência genômica SARS-CoV. O efeito da temperatura sobre o RNA-DNA também foi estudado. Yang et al. concluiu que este método pode proporcionar a afinidade de interação com alta sensibilidade.

Solanki 2008 e colaboradores utilizaram monocamadas auto-organizadas (SAM) sobre a superfície do sensor da SPR para detectar toxicantes utilizando ácido nucléico. Eles imobilizaram covalentemente a molécula de DNA *calthymus* sobre as SAMs de β -mercaptoethanol (MEC) formadas na superfície do sensor de ouro da SPR. O complexo DNA-MCE-SAM foi caracterizado por espectroscopia de impedância eletroquímica, voltametria cíclica, medidas de ângulo de contato e microscopia de força atômica,

respectivamente. Esta plataforma também foi utilizada para a detecção do inseticida piretróidecipermetrina (0,0005 ppm) utilizando as técnicas eletroquímicas e SPR em conjunto.

German et al. 2013 desenvolveu uma metodologia utilizando a técnica SPR para detectar o hormônio de crescimento humano (hGH). A metodologia baseia-se na aplicação de fragmentos de anticorpos contra o hormônio de crescimento humano (anti-hGH). Os grupos típicos nativos de anti-hGH foram liberados por separação do anticorpo anti-hGH intacto usando o agente de redução de 2-mercaptoetilamina (2-MEA) em dois tamanhos de fragmentos (frag-anti-hGH), enquanto preservava os sítios de ligação aos antígenos ativos. Depois, frag-anti-hGH foram imobilizados sobre a superfície de ouro do sensor SPR por quimissorção. As concentrações de anticorpos e 2-MEA foram otimizados no que diz respeito ao desempenho do imunossensor e a morfologia da superfície do imunossensor foi estudada por microscopia de força atômica. A ligação do hGH à superfície do sensor foi muito específica e o respectivo imunossensor apresentou um limite de detecção de 0,0034 μM de hGH. Uma boa repetibilidade do sinal e seletividade analítica sobre o hormônio do crescimento foram demonstrados e também uma boa estabilidade operacional que foi satisfatória no prazo de 18 dias.

Vidic et al. 2013 realizou a detecção da proteína do vírus da gripe PB1-F2 expresso na influenza A, utilizando anticorpo monoclonal específico anti-PB1-F2 através da técnica SPR demonstrando ser possível avaliar a concentração de PB1-F2 em células e tecidos infectados. O imunossensor foi aplicado com sucesso na detecção e quantificação de PB1-F2 em pulmões de ratos infectados e linhagens de células, proporcionando perfis de expressão temporal de PB1-F2 durante a infecção viral. Nos pulmões de ratos infectados a nucleoproteína estrutural do vírus da gripe NP foi detectada em paralelo, utilizando um anticorpo anti-NP específico. De acordo com os resultados obtidos para a detecção paralela do PB1-F2 e NP, o autor sugeriu que através do desenvolvimento dessa metodologia a detecção simultânea de todas as proteínas do vírus da gripe conhecidos em tecidos infectados e células podem ser possíveis.

2 OBJETIVO

2.1 Objetivos Gerais

O objetivo deste projeto foi propor o desenvolvimento de novas metodologias utilizando diferentes técnicas de detecção do vírus da cinomose canina e testa-las em amostras biológicas reais.

2.2 Objetivos Específicos

- ✓ *Preparação e caracterização das monocamadas auto-organizadas sobre a superfície de ouro da SPR.*
- ✓ *Caracterização da proteína imobilizada sobre a superfície do sensor SPR.*
- ✓ *Desenvolvimento de uma metodologia analítica para a determinação em amostras biológicas.*
- ✓ *Introdução da proteína A como molécula intermediadora.*
- ✓ *Detecção do vírus da cinomose utilizando LSPR.*
- ✓ *Validação das metodologias propostas.*

3 PARTE EXPERIMENTAL

3.1 Reagentes Utilizados

Ácido 11- ácido mercaptoundecanóico (MUA), N-hidroxissuccinimida (NHS) e N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida (EDC), etanol, tween 20, glicina, albumina sérica bovina (BSA), ácido monocarboxílico ferroceno (FcMA), citrato de sódio ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$), detergente Alconox, (III) cloreto de ouro trihidrato (HAuCl_4), proteína A de *Staphylococcus aureus* extracelular solúvel 1 mg/mL e tampão fosfato salino (PBS) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). Água deionizada utilizada em todos os preparos das soluções foi obtida a partir de uma unidade Millipore Milli-Q (EUA)

3.2 Anticorpos

O vírus da cinomose foi obtido através da coleta de amostras de urina virais de animais com histórico e sinais clínicos compatíveis com a cinomose. As amostras foram extraídas utilizando um kit de RNA de Mini rotação (GE Healthcare). A presença do CDV foi confirmada utilizando a técnica de PCR. O material foi inoculado em monocamada de células Madin-Darby Canine Kidney (MDCK) que mostrou 80% de confluência em Meio Essencial Mínimo (MEM), com 1% de soro fetal bovino. O soro fetal bovino foi armazenado a -70°C até a sua utilização. A suspensão do vírus foi purificada utilizando um gradiente sacarose de 20% a 60%. O material foi dividido em alíquotas, e cada fração foi lida em um comprimento de onda de 260 nm e 280 nm. As frações correspondentes a densidade de $1,18\text{g}/\text{cm}^3$ foram separadas e armazenadas a -70°C para posterior quantificação da proteína utilizando o método BCA de acordo com a referência.

Os anticorpos policlonais contra CDV foram obtidos por inoculação subcutânea de uma suspensão de vírus purificada contendo 50 g/mL de proteína em cobaias. Soluções de antígenos preparadas foram emulsionados com adjuvante completo de Freund (v/v), 500 mL foram inoculados e o procedimento foi repetido após 20 dias. Trinta dias após a inoculação inicial, os animais foram sangrados e o soro foi inativado a 56°C durante trinta minutos, dividido em alíquotas de 2 mL e armazenados a -20°C até à sua utilização.

3.3 Amostras

As amostras de urinas positivas e negativas foram fornecidas pelo laboratório de Diagnóstico Molecular, Departamento de Microbiologia e Imunologia, Instituto de Biociências, UNESP, campus de Botucatu e são provenientes de animais atendidos no Ambulatório de Enfermidades Infecciosas dos Animais do Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia- UNESP- Botucatu. Todas as amostras utilizadas no experimento foram previamente testadas pela técnica de PCR.

3.4 Materiais e Equipamentos

3.4.1 Ressonância Plasmônica de Superfície (SPR)

As interações moleculares entre o anticorpo policlonal e o CDV foram investigadas utilizando um equipamento de ressonância plasmônica de superfície- SPR (AutoLab Springle®, Eco Chemie, Holanda). O sensor da SPR é um disco de ouro e foi adquirido a partir da Autolab. Apresenta um diâmetro de 17 mm com uma espessura de ouro de 50 nm. Este sensor de ouro foi colocado em um prisma semi-cilindro e inserido no instrumento Autolab SPR para realização das análises.

3.4.2 Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIS)

Os experimentos da espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS) foram realizados utilizando um equipamento ECO Chemie Autolab Microautolab III/FRA2 com um analisador eletroquímico e o pacote de software GPES 4.9 (General Purpose Electrochemical System). Todos os experimentos foram realizados utilizando um sistema de três eletrodos, contendo um contra-eletródo de fio de platina, um eletrodo de referência saturado com Ag/AgCl (3 mol L^{-1}) e o disco de SPR como o eletrodo de trabalho. Os experimentos da espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS) foram realizados em solução tampão PBS 10 mM com $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de FcMA. A solução tampão foi desoxigenada com N_2 durante 10 minutos antes das medições eletroquímicas. As medições foram realizadas sob a tensão de circuito aberto com uma configuração de duas sondas em que o eletrodo de referência separado não foi utilizado. Todos os espectros de impedância foram ajustados aos circuitos elétricos equivalentes utilizando software ZView.

3.4.3 Ressonância Plasmônica de Superfície Localizada (LSPR)

As análises da LSPR foram realizadas utilizando um espectrofotômetro de Ultravioleta- Visível (UV-vis) Biohrom Lira S11 (Biochorm Ltd, Inglaterra). Os espectros foram obtidos em um comprimento de onda de 400-800 nm com passo de 1nm e velocidade de varredura de 500 nm min⁻¹, utilizando cubeta de vidro. Para fazer o espectro de referência, foi utilizada água deionizada Milli-Q antes de cada medida.

3.4.4 Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM)

Os aspectos e modificações das nanopartículas de ouro foram caracterizados pela técnica de microscopia eletrônica de transmissão (TEM), as imagens foram adquiridas utilizando um Tecnai Spirit (FeiCompany). As grades utilizadas como suporte para obtenção das imagens foram recobertas com parafina e sobrepostas sobre uma gota da amostra desejada por 5 minutos, em seguida deixada para secar a temperatura ambiente durante toda a noite em vidro tampado.

3.5 Procedimentos

3.5.1 Limpeza do sensor e preparação das monocamadas auto-organizadas (SAMs)

A limpeza do sensor de ouro da SPR foi realizada colocando-o em um beaker com detergente industrial e água deionizada em ultrassom durante 10 min. Em seguida, o disco foi lavado três vezes com água deionizada, álcool e novamente água deionizada, sendo seco em papel de lente. Após a etapa de limpeza, o sensor foi introduzido no equipamento e modificado pela deposição das monocamadas auto-organizadas (SAMs). As SAMs foram formadas utilizando-se alcanotióis obtidos pela deposição de solução de alcanotiól, onde ocorreu a adsorção irreversível do tiol selecionado à superfície do sensor de ouro. A solução para formação das SAMs foi preparada utilizando 0,02 g de MUA em 100 µL de etanol absoluto. Desta solução, 5 µL foram adicionados em 4,95 mL de etanol obtendo-se então a solução final. 200 µL desta solução foram adicionadas à superfície do sensor permanecendo durante toda a noite. No dia seguinte, a superfície foi lavada com uma solução contendo tampão fosfato pH 7,4 (PBS) e Tween 20 (0,005%) três vezes. Uma sequência repetitiva utilizando uma solução tampão 10×10⁻³ mol L⁻¹ de PBS, pH 7,4 foi usada para a estabilização

da monocamada e para o passo de imobilização. Os grupos carboxílicos terminais dos ligantes foram ativados com uma mistura 1:1 de 0,4 mol L⁻¹ de EDC e 0,1 mol L⁻¹ de NHS durante 50 minutos. Na sequência, o sensor foi lavado com 10×10⁻³ mol L⁻¹ de PBS + 0,1% de Tween 20, estando pronto para os experimentos.

3.5.2 Preparação das nanopartículas de ouro

A produção das nanopartículas de ouro foi realizada através da mistura de duas soluções, H₂AuCl₄ 1,0 mmol L⁻¹ e Na₃C₆H₅O₇ 39 mmol L⁻¹. A primeira solução foi preparada diluindo 0,005 g de H₂AuCl₄ em 10 mL de água deionizada Milli-Q e a segunda, a partir da diluição de 0,1 g de citrato de sódio em 10 mL de água deionizada Milli-Q. Após esta etapa, em um erlenmeyer sobre um agitador magnético foram adicionados 3,0 mL da solução de H₂AuCl₄ juntamente com 17,0 mL de água Milli-Q. Essa solução foi misturada utilizando uma barra magnética e aquecida até o ponto de ebulição. Após isso, 2 mL da solução de Na₃C₆H₅O₇ foi adicionada ao erlenmeyer fazendo com que a solução que apresentava uma cor amarelada passasse para vermelho sangue em apenas alguns segundos. Quando a solução atingiu essa coloração, a temperatura foi desligada e a solução permaneceu em agitação por mais 5 minutos. Essa solução foi transferida para um tubo falcon até seu resfriamento que ocorreu em temperatura ambiente e então foi armazenada em um vidro escuro na geladeira. O citrato de sódio reduziu os íons do ouro para nanopartículas de ouro metálico e o excesso de ânions do citrato na solução manteve a superfície metálica do ouro, dando uma carga negativa para cada nanopartícula (MCFARLAND et al., 2004).

3.5.3 Utilização das nanopartículas de ouro para detecção do CDV utilizando UV-Vis

Uma das análises realizadas para o diagnóstico do CDV foi através da técnica de LSPR utilizando como base nanopartículas de ouro, sendo todo processo realizado em um equipamento de UV-Vis. O experimento foi realizado adicionando 1 mL da solução de nanopartículas de ouro em um tubo falcon. 100 µL da solução de MUA foram adicionados ao tubo para a formação das monocamadas auto-organizadas (SAMs). Após 1 hora, essa solução foi ativada com a adição de 100 µL da solução 1:1 de 0,4 mol L⁻¹ de EDC e 0,1 mol L⁻¹ de NHS, que criaram ligações covalentes com as amins dos anticorpos. Subsequentemente, 50 µL de anticorpos foram adicionados ao tubo falcon e finalmente 50 µL da amostra de urina

positiva foi adicionada para fazer a detecção do CDV. A adição de cada solução ao tubo falcon foi realizada de 40 em 40 minutos e para obter o controle experimental todas as etapas foram realizadas utilizando amostra de urina negativa testada previamente pela técnica RT-qPCR. Na figura 9 está esquematizado todo o processo de ligação que ocorreu dentro do tubo falcon. As nanopartículas de ouro são modificadas pela deposição das SAMs e ativadas por EDC/NHS, criando ligações covalentes com as aminas dos anticorpos que foram atraídos pelo vírus CDV.

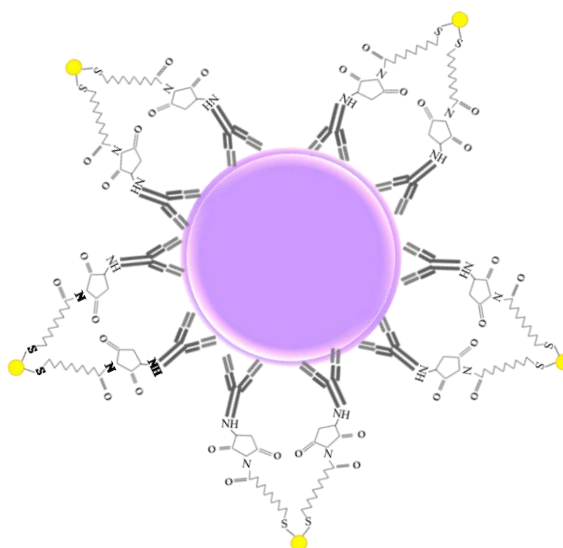


Figura 9: Representação da ligação do vírus CDV ao anticorpo que está ligado as nanopartículas modificadas por EDC/NHS e monocamadas auto-organizadas.

4 RESULTADO E DISCUSSÃO

4.1 Detecção do Vírus da Cinomose Canina Utilizando Ressonância Plasmônica de Superfície (SPR) e Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIS)

A primeira etapa do projeto consistiu do desenvolvimento de uma metodologia de acoplamento do anticorpo ao CDV sobre o disco de ouro do SPR. Foram utilizados grupos carbóxicos para o acoplamento do anticorpo sobre o sensor de ouro. Inicialmente utilizamos uma monocamada auto-organizada (MUA). Após o qual o anticorpo foi imobilizado por meio da formação de ligações com as aminas. O grupamento EDC/NHS foi utilizado para ativar e promover a formação de ligações covalentes através da formação de grupos N-hidroxisuccinimida. A figura 10 mostra a resposta obtida pela SPR após injeções de: MUA formando as monocamadas auto-organizadas, ativação dos grupos carboxílicos utilizando solução de EDC/NHS, a imobilização do anticorpo e a adição de BSA como agente de bloqueio para evitar qualquer resposta não específica. A linha base inicial foi obtida quando a superfície do ouro já tinha sido tratada utilizando MUA. Após a injeção da solução de EDC/NHS que permaneceu por 50 minutos, foi realizada a injeção de 50 μL da solução de anticorpo sobre a superfície do sensor de ouro que permanecendo por 50 minutos e foi acompanhada por uma mudança no ângulo de ressonância monitorada continuamente pelo sistema SPR. A mudança do ângulo da SPR foi utilizada para calcular a quantidade de anticorpo adsorvido na superfície. O ângulo de ressonância deslocou aproximadamente 1,180 RU o que corresponde a 9,8 ng/mm^2 . Nesta etapa, a concentração de anticorpo utilizado foi de 51,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$. A reprodutibilidade da metodologia foi calculada pela repetição de cinco ensaios e mostraram um coeficiente de variação de 8,0%. Para minimizar as ligações não específicas que ocorrem na superfície do sensor, solução de albumina sérica bovina (BSA) 5 mg/mL (PBS) foi utilizada para ocupar os espaços remanescentes. Segundo Chen et al., 2009, o BSA vem sendo usado nas pesquisas como um dos mais tradicionais agentes bloqueadores, pois apresenta algumas características singulares, tais como: boa distribuição aleatória sobre a superfície do sensor, é um método químico simples e possui um baixo custo. Neste trabalho, o BSA foi utilizado para ocupar os espaços remanescentes entre os anticorpos, impedindo que ocorra a ligação do CDV com a superfície do sensor. Com a introdução do BSA, os vírus apenas conseguiram realizar as ligações com os sítios ativos dos anticorpos ali presentes.

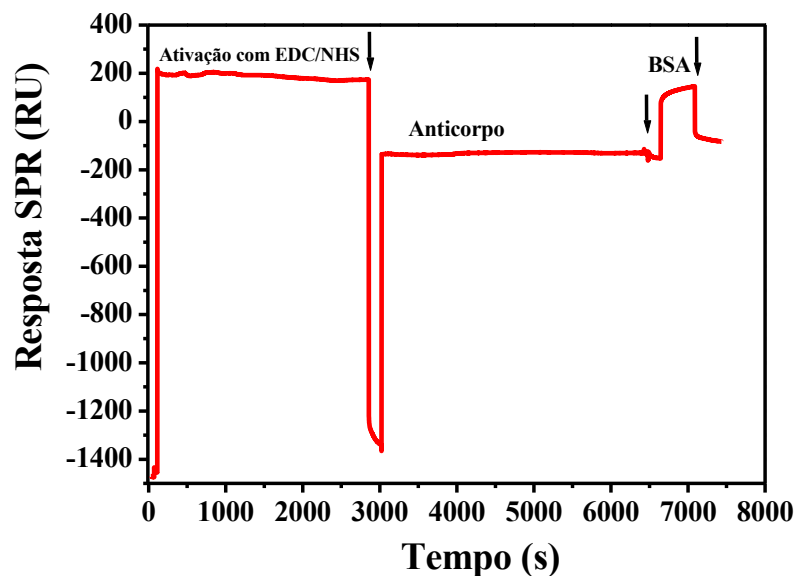


Figura 10: Sensorgrama mostrando os passos experimentais: modificação da superfície com EDC/NHS, anticorpo e BSA. ↓ setas indicam o início do passo de lavagem com tampão PBS 10 mM (pH 7,4) contendo 0,1% de Tween 20.

Para avaliar a cinética de ligação do sistema anticorpo na superfície do sensor, foi utilizado o software de avaliação cinética do próprio equipamento Autolab (software Data Acquisition). As análises foram realizadas adsorvendo o anticorpo diretamente à superfície do sensor. A figura 11 demonstra anticorpos imobilizados em diferentes concentrações sobre a superfície do sensor de ouro. Após cada injeção a superfície do sensor foi regenerada utilizando uma solução de $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ de glicina-HCl (pH 3,0). Durante a preparação das camadas, o sinal da SPR foi medido em tempo real e o valor da massa foi calculado a partir das alterações na linha base antes e depois da injeção de cada amostra. As respostas da SPR obtidas pela ligação do anticorpo ao sensor aumentaram nas concentrações de A e B, e depois diminuíram com as altas concentrações das soluções de anticorpos. Estes resultados indicam que a maioria dos sítios ativos da ligação com os antígenos foram bloqueados devido às imobilizações aleatórias na superfície do sensor, enquanto que as concentrações baixas de anticorpos adsorveram de maneira mais uniforme. A constante de afinidade (k_a) foi obtida a partir do declive do sinal da SPR versus a concentração do anticorpo, e o valor obtido foi de $8,4 \times 10^5 \text{ mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Estes resultados são semelhantes ao encontrado por Minkstimiene et al. 2010, quando se estudou o efeito da imobilização aleatória e orientada do anticorpo. Neste experimento, Minkstimiene et al. 2010 utilizou anticorpos contra o hormônio do crescimento humano (anti-HGH) testando quatro tipos de ligações na superfície do sensor, sendo elas imobilização aleatória utilizando SAM, imobilização aleatória utilizando carboximetil dextrano através de ligação covalente, imobilização orientada pela proteína G através de SAM

e imobilização direta na superfície do ouro através de grupos funcionais tiol ativos presentes no anticorpo, demonstrando K_a de ligação para cada teste.

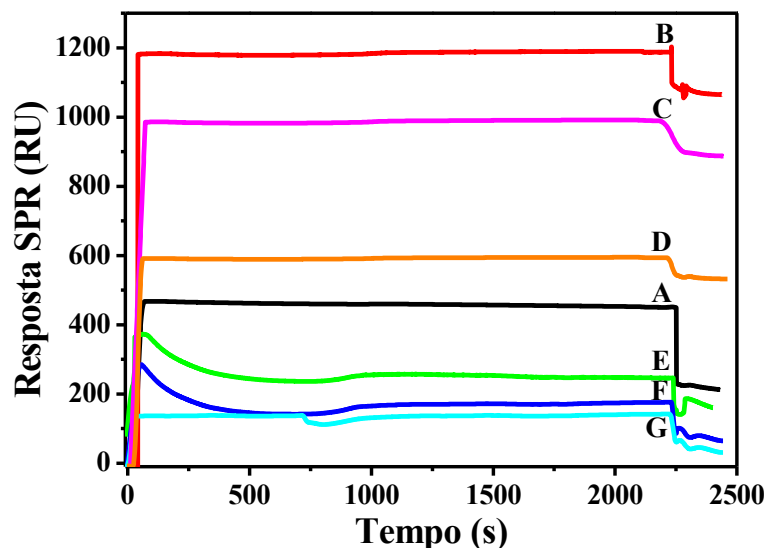


Figura 11: Adsorção e ligação dos anticorpos sobre a superfície do sensor em diferentes concentrações: A) 0,25, B) 0,5, C) 1,0, D) 2,0 E) 10,0, F) e 20,0 L) 50,0 µg L⁻¹ em 10 mM PBS.

Após as otimizações dos parâmetros envolvidos, foi construída uma curva de calibração para detecção do CDV utilizando SPR. A figura 12A mostra a injeção de diferentes concentrações de CDV. Após cada experimento utilizando o CDV, as ligações antígeno/anticorpo foram rompidas e a superfície foi regenerada utilizando 0,2 mol L⁻¹ de glicina-HCl (pH 3,0) para a injeção de uma nova amostra do vírus. A resposta do sinal do SPR aumentou proporcionalmente com a concentração de CDV obtendo uma resposta linear entre a concentração na faixa de 1,1 à 1160,0 ng mL⁻¹ com equação de reta igual a $\Delta\theta = 7,8 + 4,28x$, $R^2 = 0,98$, combinado com um baixo erro relativo de 4,8% (figura 12B). O limite de detecção (LOD) foi calculado utilizando este domínio de alta sensibilidade. O LOD foi calculado usando três vezes o ruído no gráfico de SPR combinado com o declive da região altamente sensível. O limite de detecção para o CDV foi de 0,1 ng L⁻¹ e a frequência de análise pode ser estimada em 15 amostras por dia. A saturação da ligação do CDV foi de 1,1 ng mL⁻¹ (6.7 RU) corresponde a uma capacidade de ligação de 0,05 ng mm⁻². Este resultado é comparável aos esforços anteriores para diagnosticar o CDV por métodos convencionais, incluindo microscopia eletrônica, PCR e ELISA (FRISK et al., 1999; KIM et al., 2001; RZEZUTKA; MIZAK, 2002). No entanto, estes métodos requerem esquemas de detecção de

múltiplos passos. Em contrapartida, esta metodologia proposta requer menos de 3 horas para um diagnóstico completo, incluindo a etapa de modificação.

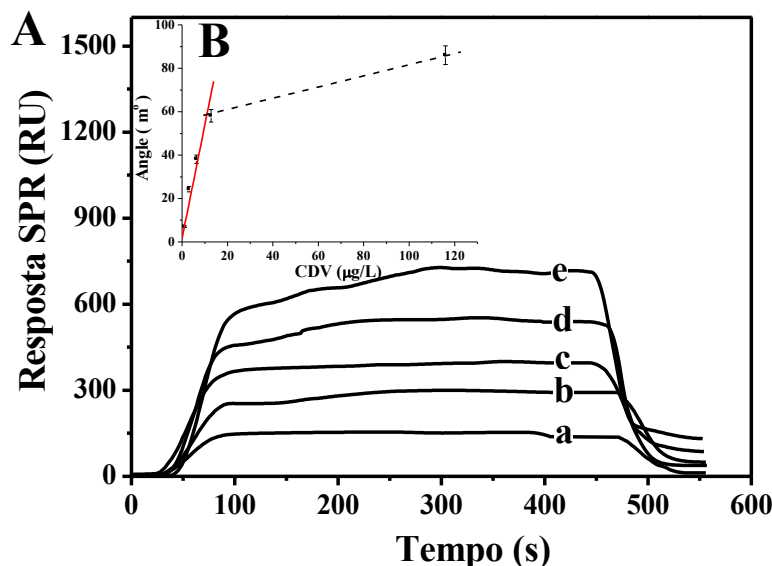


Figura 12: Resposta do sensor SPR para a interação de diferentes concentrações de antígenos com os anticorpos imobilizados. A) (a) 1,1, (b) 2,3, (c) 5,8, (d), 11,0 e (e) 116,0 µg L⁻¹. O experimento foi realizado na temperatura ambiente em PBS 10 mM, pH 7,4 e após a injeção de cada amostra a linha de base foi restaurada por injeção de 0,2 M de glicina-HCl (pH 3,0). B) Fit linear da concentração do CDV realizado em triplicata.

A vantagem deste imunossensor sobre outras técnicas tal como ELISA é a capacidade de reutilização da superfície do sensor. A quebra da ligação não covalente entre o anticorpo e o CDV utilizando solução de regeneração glicina é essencial para o uso repetitivo do sensor e para a manutenção da funcionalidade do anticorpo. Nos ensaios foram utilizados 0,2 mol L⁻¹ de glicina-HCl como solução de regeneração, BSA e CDV sequencialmente. A eficiência de cada regeneração foi determinada através do monitoramento da variação do sinal de resposta devido à ligação de CDV com o sensor modificado antes e depois da regeneração. Os resultados não mostraram nenhuma diferença no sinal de resposta em relação com a concentração de CDV ou BSA. Os resultados para 10 determinações sucessivas do CDV (concentração fixa de 10,0 mg L⁻¹) nas mesmas condições, mostraram o valor de apenas 4,7% para o coeficiente de variação de corrente medido (RSD). Isto significa que a vantagem da utilização da solução glicina-HCl é a quebra de ligações não covalentes sobre a superfície do sensor sem afetar a reatividade imuno dos anticorpos imobilizados.

Para melhor compreender a imobilização do anticorpo sobre a superfície do sensor e para caracterizar as propriedades elétricas da tensão interfacial, espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS) foi realizada durante cada passo de imobilização do anticorpo e na

presença do CDV em PBS (pH 7,4) contendo $10 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de FcMA. O estudo do processo interfacial é de grande importância para a avaliação dos problemas associados com a metodologia de imobilização. Assim, os estudos destes processos podem ajudar na escolha de um meio mais adequado de imobilização e também indicar as principais características associadas a cada passo do método de imobilização. Na figura 13 estão os resultados obtidos por espectroscopia para cada etapa de modificação. Tal como anteriormente estabelecido, o gráfico de impedância do eléctrodo de ouro apresenta um sistema Faradaico incluindo uma correlação linear de Z_{im} (Z-imaginário) e Z_{RE} (Z-real) a baixas frequências, o que indica uma região de difusão controlada que corresponde à impedância Warburg. Uma região semicircular em frequências mais altas indicando uma parte cinética determinada pela resistência de transferência de elétrons. A resistência de transferência de elétrons (R_{et} , o diâmetro do semicírculo) da sonda redox mediu a reatividade FcMA na modificação por MUA (curva a), ativação com EDC/NHS (curva b), modificação com anticorpo (curva c), adição da solução de BSA (curva d) e $1,1 \text{ ng mL}^{-1}$ de CDV (curva e) sendo 1,1; 2,0; 2,6; 2,9 e $4,2 \text{ K}\Omega$, respectivamente.

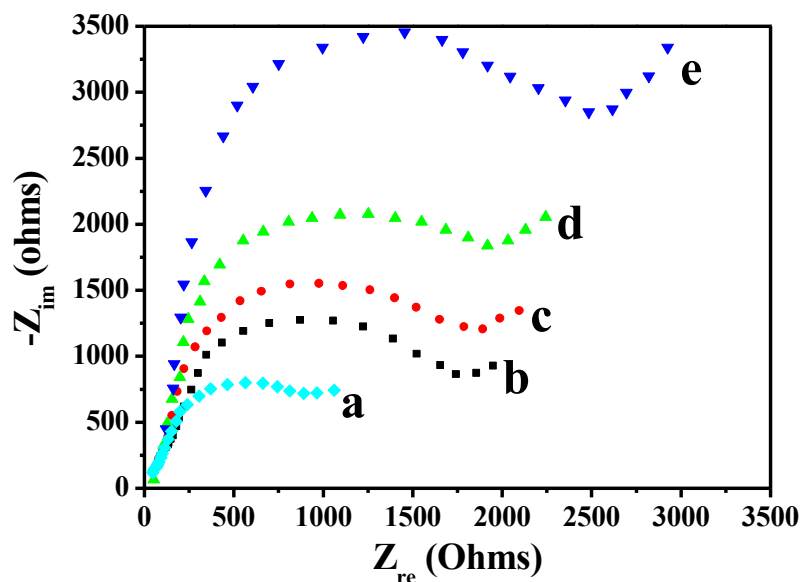


Figura 13: Gráfico de espectroscopia da modificação no eléctrodo de ouro MUA (a), ativação EDC/NHS (b), imobilização de anticorpos (c), bloqueio com BSA (d) e ligação do CDV (e) em potencial de 0,3 Vvs. Ag/AgCl em 10 mM PBS (pH 7,4) contendo 10 mM de FCMA.

A Figura 14A apresenta os dados experimentais dos diagramas de Nyquist medidos para o eletrodo de ouro exposto a soluções contendo diferentes concentrações de CDV. Como

esperado, em todos os casos os espectros de EIS estão representados pelas curvas de semicírculos. A fixação de partículas virais na superfície do ouro funcionalizado leva ao aumento da resistência de transferência de elétrons. Uma resposta linear caracteriza o sinal medido para concentrações virais entre 0 e 12 ng mL⁻¹, com um coeficiente de correlação de 0,995. O limite de detecção do imunossensor proposto foi de 1,2 ng mL⁻¹ (S/N=3). Os resultados também demonstram que o sinal a 115 ng L⁻¹ está próximo da saturação. Estes dados foram ajustados para o circuito equivalente Randles para obter a resistência de transferência de carga (R_{CT}) em toda a interface após a adição do analito para cada concentração de vírus aplicada. Para determinar a especificidade do sensor em detectar o CVD, os controles foram efetuados utilizando amostras negativas e positivas previamente testadas por PCR. A figura 14B mostra um leve aumento nos experimentos de controle negativo quando ocorre aumento da concentração, mas não na mesma proporção quando comparado com as injeções de CDV em controles positivos. Este teste revelou um sinal insignificante na EIS para todas as concentrações de CDV estudados, sendo consistente com a especificidade esperada do anticorpo.

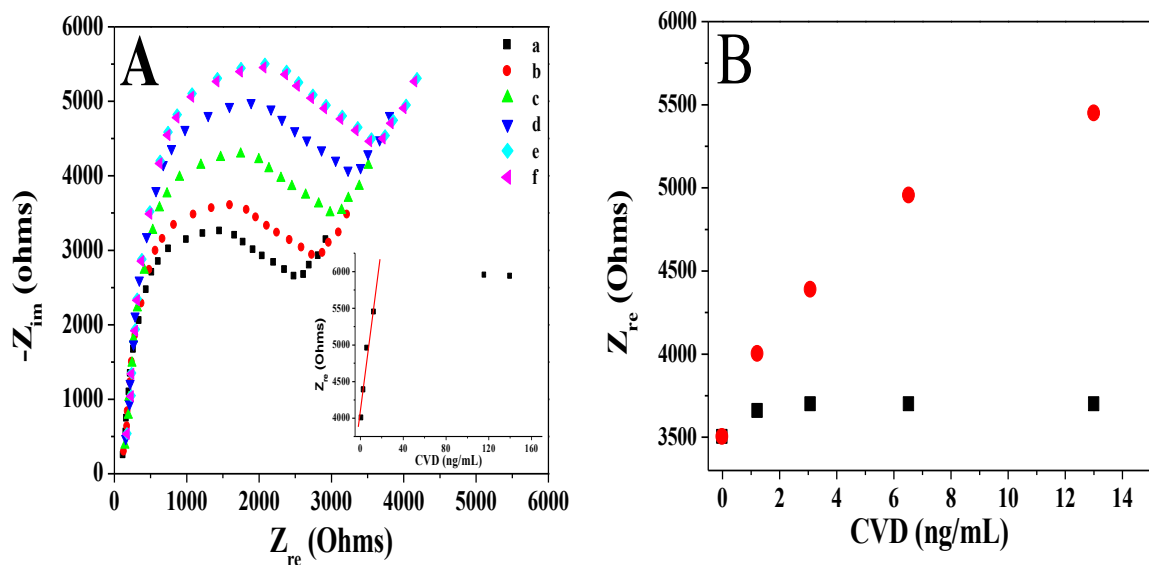


Figura 14: A) Espectro de impedância medido para o anticorpo funcionalizado exposto ao eletrodo com CVD em 1 ng mL (a), 3 ng mL (b), 6 ng mL (c), 13 ng mL (d), 115 ng mL e (f) 160 ng mL. B) Curva de calibração R_{CT} no imunossensores compreendendo tanto amostra positiva (●) e controle negativo (●).

Amostras de urinas positivas e negativas do vírus CDV foram utilizadas para avaliar a seletividade do imunossensores. A amostra de urina negativa tem o potencial de produzir sinais falsos em imunoenaios devido às interações entre os constituintes da amostra com um ou mais anticorpos reagentes. Podem incluir-se compostos com as diferenças químicas, mas

semelhanças estruturais que reagem de forma cruzada com o anticorpo, anticorpos heterófilos e outras proteínas. Para medir a resposta das amostras de urinas com CDV através da técnica SPR (diferentes diluições), estas foram injetadas sobre a superfície do sensor e incubadas durante 10 min. Após esse tempo, os vírus que não se ligaram aos anticorpos foram removidos por lavagem com tampão PBS/Tween e a mudança no ângulo de ressonância foi monitorada por cerca de 500 segundos. A resposta para o controle negativo produziu um ruído de menos de 1 RU (SPR). Como o controle negativo não se ligou ao anticorpo e não houve qualquer efeito sobre a resposta da SPR, estes dados confirmam a nossa conclusão de que a ligação do CDV com o anticorpo foi altamente específica. A metodologia proposta demonstrou que a cinomose canina foi detectada em quase 100% das amostras examinadas, e ambas as técnicas demonstraram a presença viral do CDV. Os experimentos foram realizados em triplicata e verificou-se que ambas as técnicas (SPR e EIS) não diferiram significativamente, indicando que a matriz do complexo biológico (presença de diferentes compostos orgânicos na urina) não influenciou a detecção do CDV. Os resultados obtidos com ambas as metodologias mostraram eficiência e constituiu uma alternativa interessante e desejável para a detecção do CDV com maior seletividade e sensibilidade.

4.2 Utilização da proteína A para detecção do CDV utilizando a técnica SPR

Nesta nova etapa do trabalho foi testado o uso da proteína A para melhor orientar os anticorpos imobilizados, pois até aqui a imobilização ocorria de forma aleatória. A proteína A foi explorada como molécula intermediária para o controle da orientação dos anticorpos, pois devido a sua afinidade natural de ligar-se especificamente à porção Fc da imunoglobulina IgG, os anticorpos conjugados à proteína A deixam exposto o fragmento Fab da imunoglobulina para reagir com o antígeno, aumentando a sensibilidade do teste. Quando utilizamos a proteína, a orientação e a pureza podem ser melhoradas permitindo a regeneração de um ligante de captura secundário. A proteína em particular tem sido demonstrada ser útil numa variedade de aplicações bioanalíticas, mostrando de forma eficaz a orientação de anticorpos IgG para a detecção de bactérias e vírus em estudos (SONG et al., 2012). A imobilização da proteína presente na superfície do sensor não bloqueou os sítios ativos dos anticorpos.

A figura 15 mostra a resposta em tempo real do sensor de SPR. Primeiramente a ativação das monocamadas auto-organizadas com EDC/NHS, seguida pela lavagem com

tampão fosfato pH 7,4 (PBS) e Tween 20 (0,005%) para a retirada do material fracamente ligado, seguido pela injeção do anticorpo à superfície do sensor e subsequentemente o bloqueio dos espaços remanescentes na superfície utilizando BSA (1 mg mL⁻¹). Neste experimento, as moléculas de anticorpos adotaram todas as orientações possíveis, devido à disponibilidade de grupos amina em diferentes regiões do anticorpo. A ligação do anticorpo anti-CDV com as monocamadas auto-organizadas resultou em um deslocamento no ângulo de ressonância de aproximadamente 13,1 RU, que corresponde a 0,1 ng mm². Estudos de especificidade foram realizados para demonstrar o reconhecimento imune-específico entre o anticorpo e o vírus. Para testar a eficiência do imunossensor do diagnóstico da cinomose, amostra positiva e negativa do vírus CDV foram testadas para avaliar as ligações específicas com os anticorpos. A figura 15 mostra a resposta típica do sensor SPR obtido a partir de amostras positivas e negativas. Com a obtenção destas respostas, foi possível observar que o anticorpo anti-CDV é específico para a detecção do vírus CDV, enquanto que as amostras negativas usadas como controle não mostraram qualquer resposta devido à ligação não específica à superfície do sensor.

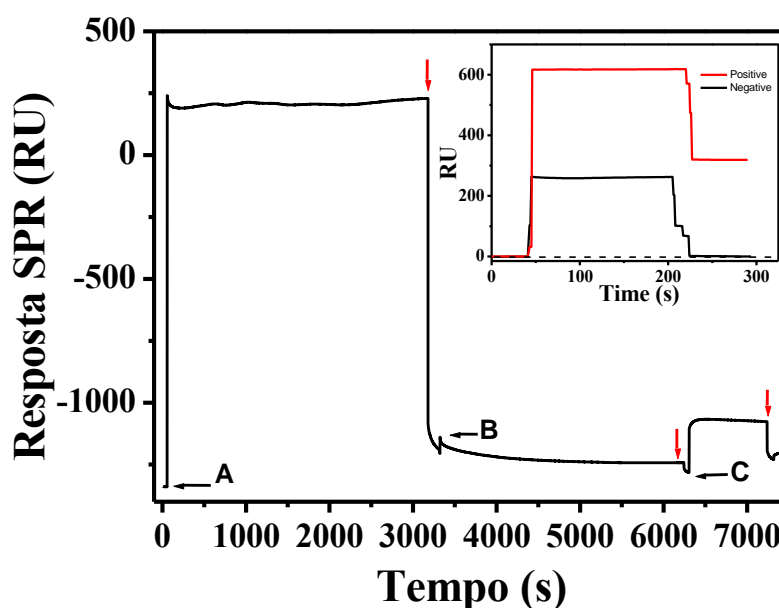


Figura 15: Sensorgrama mostrando o procedimento experimental no biossensor: (A) imobilização de 200 µL de EDC/NHS sobre as SAMs para criar ligações covalentes com as aminas dos anticorpos; (B) injeção de 50 µL de anticorpos; (C) 100 µL de BSA necessário para bloquear os espaços remanescentes entre os anticorpos. Setas para baixo (em vermelho) indicam as etapas de lavagem utilizando PBS/tween. Inserção na figura: o gráfico mostra a amostra positiva (linha vermelha) e o experimento de controle negativo (linha preta).

No segundo experimento, foi investigado o potencial de adsorção do anticorpo na presença da proteína A e as amostras analisadas foram de urinas com e sem a presença do

vírus CDV (figura 16). Os procedimentos de modificação, lavagem e ativação da superfície do sensor foram realizados utilizando a mesma metodologia do experimento anterior, apenas houve a inclusão de 35 μL da solução de proteína A na concentração de 1 mg mL^{-1} em tampão PBS pH 7,4 por 30 minutos, antes da adição do anticorpo à superfície do sensor. No passo seguinte após a adição da proteína foi realizada a lavagem da superfície utilizando tampão PBS/Tween (seta vermelha). Nesta etapa, é possível notar um aumento no sinal da SPR. Este aumento demonstra a adsorção da proteína A sobre a superfície do sensor. O ponto C no gráfico mostra a adsorção de 50 μL de anticorpo sobre a superfície do sensor modificado com proteína A, seguida pela lavagem da superfície com tampão PBS/Tween (seta vermelha). Após a lavagem, é possível observar um pequeno decaimento na linha do gráfico, indicando que houve ligação específica dos anticorpos na superfície do sensor. Na figura 16, 50 μL da amostra de urina positiva para o vírus CDV foi injetada sobre a superfície do sensor permanecendo por 20 minutos. Após a lavagem, foi observado um deslocamento de 1,176.12 RU, equivalente a $9,8 \text{ ng mm}^2$. Este resultado demonstrou que a mudança na reflectância foi maior quando se aplicou a metodologia utilizando a proteína A, quando comparado com o estudo obtido sem proteína A. Desse modo, a orientação local da proteína A aumenta a capacidade de detecção do sensor pela maior quantidade de fragmentos disponíveis para interações com o vírus. Todas as adsorções e ligações que ocorreram em cada etapa do experimento estão presente na figura 17, monitorada em tempo real.

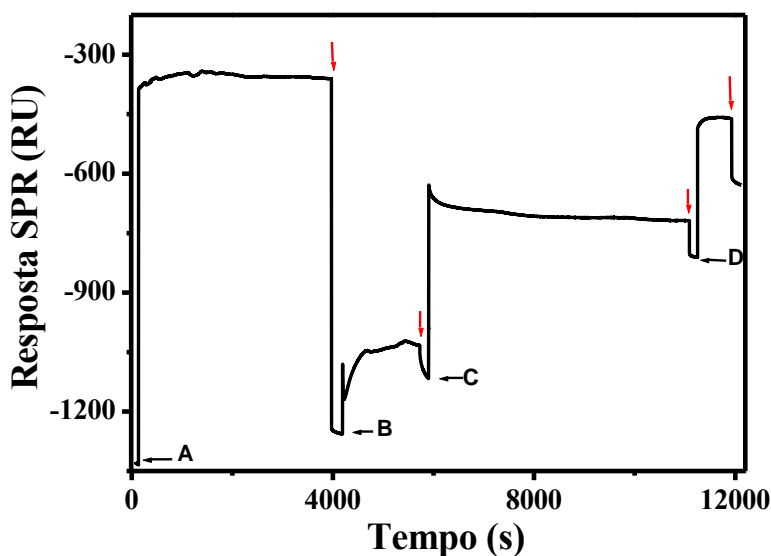


Figura 16: Sensorgrama mostrando a ligação dos anticorpos na superfície do sensor guiado pela utilização da proteína A: (A) imobilização de 200 μL de EDC/NHS; (B) imobilização de 30 μL da proteína A; (C) 50 μL de anticorpos foram adicionados para ligação à proteína A e (D) injeção de 100 μL de BSA. Setas para baixo (em vermelho) indicam as etapas de lavagem utilizando PBS/tween.

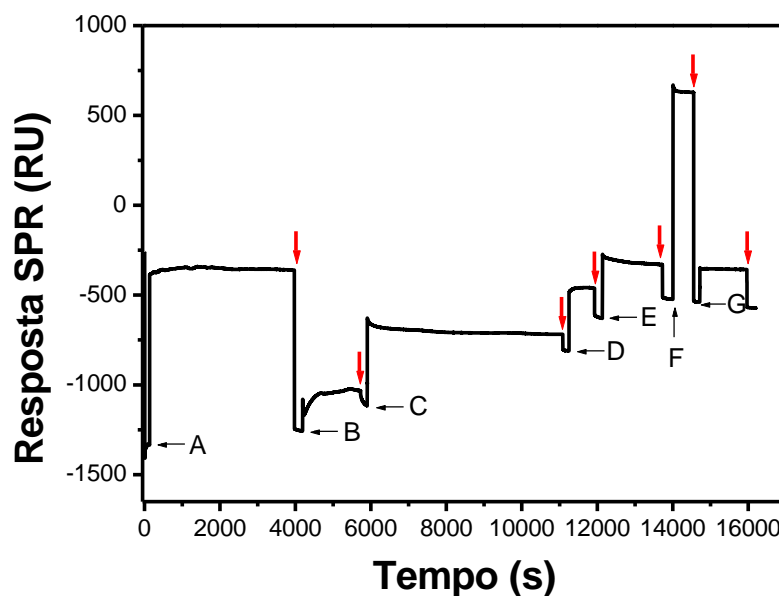


Figura 17: Gráfico final de detecção do CDV obtido pela técnica de SPR. (A) Ativação com EDC/NHS; (B) injeção da proteína A; (C) injeção dos anticorpos; (D) adição da solução de BSA; (E) ligação da amostra positiva; (F) regeneração da superfície com solução glicina pH 2,5 e (G) controle utilizando amostra negativa. As setas em vermelho indicam lavagem com tampão PBS/tween.

Para garantir a reprodutibilidade do experimento e possibilitar a análise de diferentes amostras de urinas, a superfície do sensor foi regenerada utilizando solução glicina pH 2,5 seguida por lavagem com tampão PBS/Tween, injetando as amostras positivas e negativa, respectivamente (fig. 18).

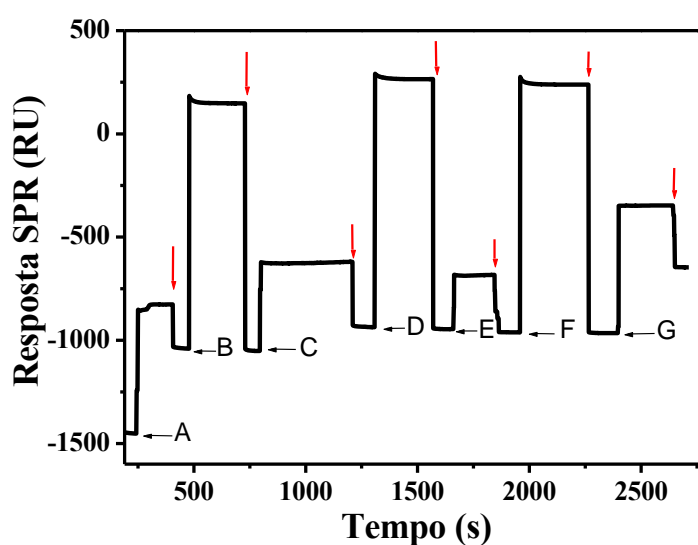


Figura 18: Sensorgrama mostrando o processo de regeneração da superfície para injeção de novas amostras. (A, C e G) injeção de 50 μ L de amostras positivas diferentes; (B, D e F) injeção de 200 μ L de glicina (passo de regeneração) e (E) 50 μ L da amostra negativa (experimento controle). As setas para baixo (em vermelho) indicam as etapas de lavagem utilizando PBS/tween.

Quando analisamos o processo de adsorção e de afinidade de ligação entre o anticorpo e o antígeno, observamos uma notável mudança na curva gerada pela SPR. A figura 19 mostra a ativação do grupo tiol sobre a superfície do sensor, sendo representada por uma linha vermelha, onde a curva apresenta um ângulo de cerca de -50 graus e estabelece o limite de detecção de aproximadamente 55 graus. A adsorção da proteína A é representada pela linha azul, onde ocorre um deslocamento ao longo da curva aumentando seu ângulo em relação à linha vermelha. Tal mudança no ângulo de SPR representa a adsorção da proteína A sobre a superfície do sensor. Do mesmo modo, a adsorção do anticorpo e do vírus sobre a superfície do sensor é representada pelas linhas preta e verde respectivamente. Este resultado mostra que houve uma ligação específica entre o antígeno e o anticorpo, uma vez que a alteração na curva de adsorção do ângulo SPR referente ao antígeno foi superior à curva do anticorpo. Se a amostra fosse negativa sem a presença do vírus CDV a mudança na curva SPR não iria ocorrer, permanecendo sobre a curvado anticorpo. O sinal da SPR foi obtido em tempo real.

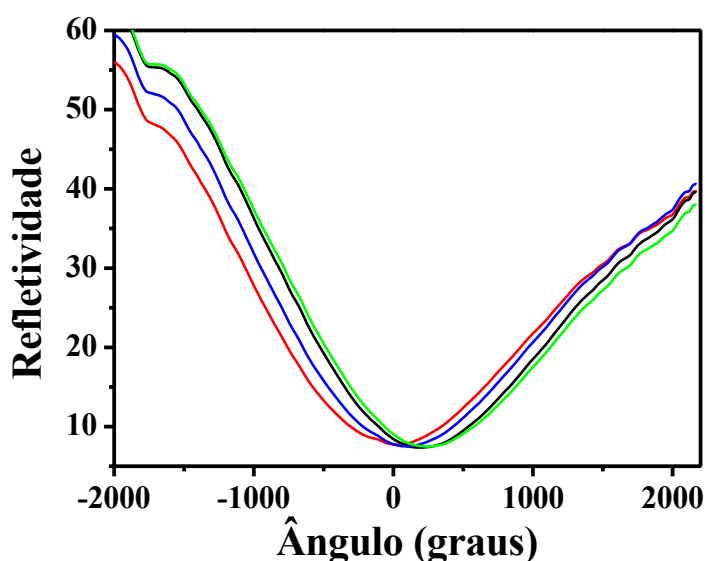


Figura 19: Gráfico com deslocamento das linhas da SPR demonstrando todo processo de ligação. Modificação da superfície com MUA e EDC/NHS (linha vermelha), injeção da proteína A (linha azul), injeção do anticorpo (linha preta) e injeção da amostra positiva (linha verde).

Diferentes condições experimentais, tais como o pH, tampão e concentrações dos anticorpos podem afetar a resposta do biossensor. A figura 20 mostra o estudo sobre a influência do número limite de anticorpos sobre a superfície do sensor para as duas metodologias. Os valores médios normalizados do sensor estão representados como em função das concentrações do anticorpo anti-CDV. A curva linear da resposta de ligação

apresenta uma forma típica, e mostra que o sinal foi saturado com a concentração de anticorpo de $30 \mu\text{g mL}^{-1}$, para ambas as abordagens. Todos os experimentos foram realizados em triplicata e as linhas verticais indicam as barras de erro. O procedimento aleatório saturou muito mais rápido do que quando comparado com os resultados utilizando a proteína A.

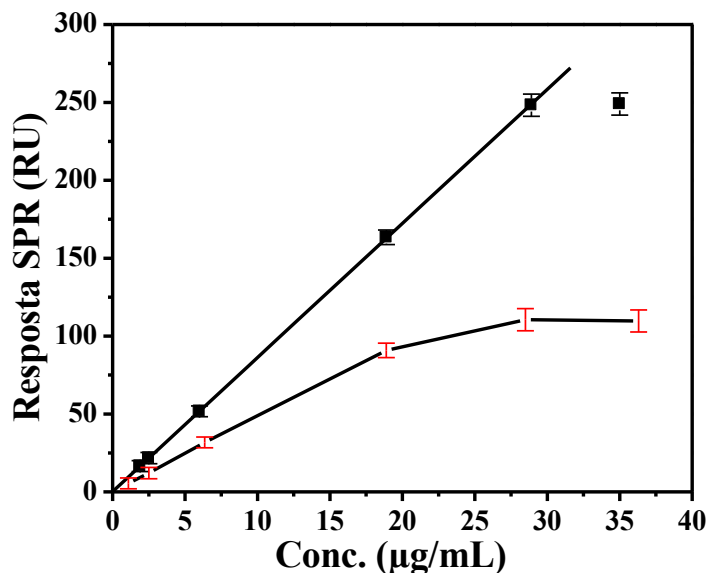


Figura 20: Resposta SPR (RU) versus concentração de anticorpo. O gráfico mostra as respostas SPR em que os anticorpos foram reticulados à proteína A.

A curva de calibração para a concentração do CDV foi obtida a fim de confirmar as observações anteriores. A resposta linear caracteriza o sinal medido para concentrações virais entre 0 e $30 \mu\text{g mL}^{-1}$ com coeficiente de correlação de $0,997$ (para proteína A) e $0,989$ (sem proteína A), como indicado pela linha sólida obtida pelos mínimos quadrados de ajuste para a proteína A. O limite de detecção do imunossensor utilizando proteína A foi de $0,1 \text{ ng mL}^{-1}$ para o procedimento orientado pela proteína A e $2,5 \text{ ng mL}^{-1}$ para o procedimento aleatório ($S/N = 3$). O valor encontrado para o procedimento orientado foi maior do que o obtido para o processo aleatório. Os nossos resultados sugerem que a ligação do anticorpo ao antígeno melhora com a presença da proteína A, uma vez que a capacidade de ligação do anticorpo resultante é definida pelo número de sítios livres (fig. 21). A repetição do experimento foi importante para aplicações reais. Além disso, testou-se a reprodutibilidade do biossensor usando o mesmo sensor preparado da mesma maneira para detectar 10 amostras de CDV seguida por regeneração da superfície. O desvio padrão relativo foi de $4,7\%$, mostrando uma boa reprodutibilidade.

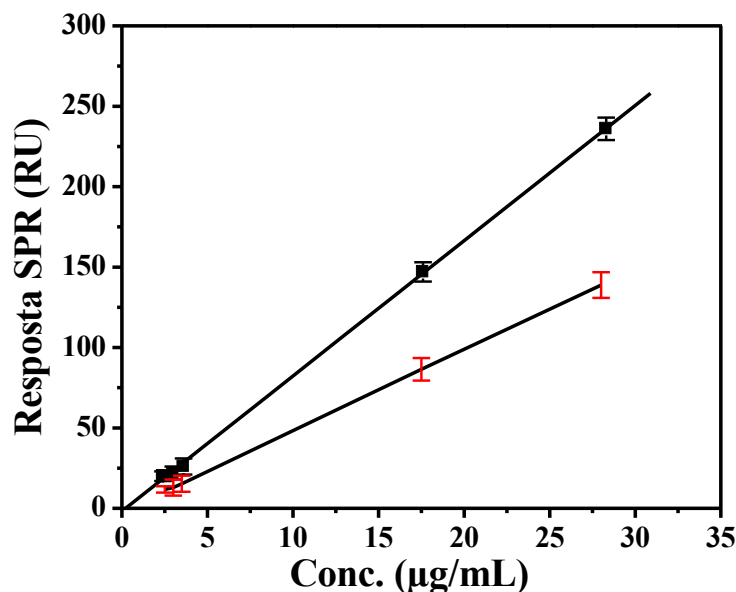


Figura 21: Curva de calibração para diferentes concentrações do CDV. A superfície foi regenerada após cada injeção de amostra. As barras de erros representam o desvio padrão das respostas em triplicatas.

Para avaliar a viabilidade da metodologia SPR utilizando proteína A, a comparação entre o método de RT-qPCR foi realizada utilizando 14 amostras positivas imobilizadas aleatoriamente. Em primeiro lugar, a superfície foi preparada com uma solução tampão PBS para formar uma linha de base na curva de SPR. O aumento do ângulo ressonante da SPR ocorre quando uma molécula entra em contato com a superfície e rapidamente é adsorvida. A diferença entre o ângulo ressonante inicial e o final determina a quantidade de material adsorvido na sua superfície. Todas as amostras de urinas positivas e negativas foram previamente testadas pela técnica de RT-qPCR, os resultados são mostrados na tabela 3. A amostra de urina número 1 apresenta a maior quantidade de vírus detectado utilizando a ligação antígeno/anticorpo pela técnica SPR, com detecção média de 1063,91 RU. A amostra de urina número 11, demonstra a menor quantidade de vírus detectado, uma média de 78,68 RU. A explicação para o fato de que a amostra de número 1 contém menos quantidades de vírus que a amostra 1 encontra-se no estudo de Griot et al. 2001. Ele explica que no vigésimo dia após o contato com o vírus, os anticorpos e linfócitos T produzidos pelo corpo do animal aparecem. Desse modo, podemos concluir que a amostra de urina número 1 foi recolhida durante os primeiros 20 dias que o animal foi infectado com o vírus. Isso explica a grande quantidade de antígenos encontrados. O desvio padrão foi medido para cada amostra de urina e o seu resultado foi comparado com os resultados médios das triplicatas. O estudo mostrou que houve uma variação de 0,1 até 1,38, que é considerado um resultado bom e confiável, uma vez que a variação em cada amostra para a quantidade de vírus adsorvido sobre a

superfície do sensor foi menor de um ensaio para outro. O experimento também foi considerado de alta sensibilidade, uma vez que pode detectar pequenas e grandes quantidades de vírus nas amostras. Por exemplo, a amostra de número 11 detectou 1,25 ng mm² e a de número 1 detectou 8,86 ng mm². Esses valores são semelhantes aos obtidos pela técnica de RT-qPCR nas mesmas condições (tabela 3), sugerindo que esta metodologia funciona de forma eficiente e simples utilizando baixo consumo de reagente e obtendo uma maior frequência de amostragem.

Tabela 3: Quantidade de vírus detectado em cada amostra de urina (em ng mm²) para SPR e RNA viral (cópias/μL) para RT-qPCR.

<i>Amostra</i>	<i>Com protein A</i>	<i>Sem proteínaA</i>	<i>RT-qPCR</i>
1	8,86 ± 0,91	8,68 ± 2,87	4,02 x 10 ⁶
2	1,51 ± 0,16	1,14 ± 1,02	8,12 x 10 ³
3	2,34 ± 0,31	2,05 ± 0,34	8,46 x 10 ⁴
4	1,55 ± 0,59	1,13 ± 1,64	1,18 x 10 ⁴
5	2,85 ± 0,71	2,52 ± 3,25	4,68 x 10 ⁵
6	2,35 ± 1,36	2,21 ± 0,25	1,20 x 10 ⁵
7	3,58 ± 1,03	3,38 ± 0,63	1,64 x 10 ⁶
8	1,38 ± 0,46	1,34 ± 1,10	5,82 x 10 ³
9	2,74 ± 0,38	2,44 ± 0,49	4,09 x 10 ⁵
10	1,55 ± 0,25	1,23 ± 0,27	1,16 x 10 ⁴
11	1,25 ± 0,58	1,07 ± 0,22	4,12 x 10 ³
12	3,40 ± 0,88	3,32 ± 0,57	7,23 x 10 ⁵
13	2,02 ± 0,48	1,78 ± 1,35	2,34 x 10 ⁴
14	2,39 ± 0,14	2,29 ± 0,40	2,65 x 10 ⁵

4.3 Detecção do Vírus da Cinomose Canina Utilizando Ressonância Plasmônica de Superfície Localizada (LSPR)

Para a detecção do CDV foi empregada uma nova metodologia utilizando a técnica de LSPR. O desenvolvimento desta nova metodologia foi elaborado com base nas nanopartículas de ouro que serviram para a produção de um novo imunossensor. Uma vez que as nanopartículas têm atraído muita atenção, devido às suas propriedades ópticas que diferem significativamente de outros metais. As nanopartículas de ouro são de grande interesse para a detecção de marcadores livres, porque o seu espectro é altamente sensível a constante dielétrica do meio circundante.

A imobilização dos anticorpos sobre as nanopartículas de ouro (AuNPs) foi investigada usando espectroscopia LSPR. AuNPs foram sintetizados de acordo com métodos químicos convencionais, utilizando citrato de sódio e uma solução de ouro coloidal, apresentando uma coloração intensamente vermelha. A primeira etapa consistiu da caracterização das AuNPs por imagem de microscopia eletrônica de transição (MET). A figura 22A mostra as AuNPs mono dispersas em uma escala de 0,1 μm , com um N= 400 apresentando diâmetro médio de 26 nm e polidispersividade de 14,3% (figura 22B). A banda de LSPR característica das AuNPs é mostrada no espectro de UV-Vis com um comprimento de onda de 525 nm, o que confirma a presença das AuNPs conforme descrito na literatura (figura 22C) (MCFARLAND et al., 2004).

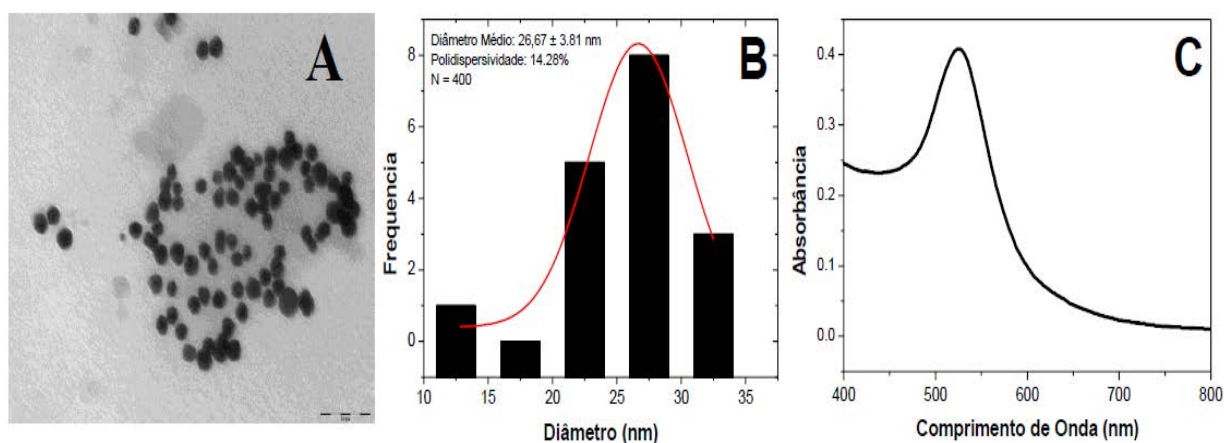


Figura 22: Imagens obtidas no MET. A) nanopartículas de ouro em uma escala de 1 μm . B) Distribuição das nanopartículas apresentando um diâmetro médio de $26,67 \pm 3,81$ nm e polidispersividade de 14,3% e C) Espectro de UV-Vis das nanopartículas mostrando a absorbância e comprimento de onda de 525 nm.

Para confirmar que os anticorpos estão ligados as AuNPs, os espectros das nanopartículas foram medidos antes e após cada etapa de conjugação (Figura 23). As AuNPs exibiram um pico máximo de 525 nm (linha preta). A medição seguinte conduziu a um pico que deslocou 6 nm, indicando a modificação com as monocamadas auto-organizadas (linha vermelha). O pico da LSPR após o tratamento com 1:1 de EDC/NHS deslocou para 533 nm (linha verde). Após a conjugação do anticorpo, houve um deslocamento do pico que foi para 616 nm, indicando a ligação do anticorpo (linha azul). Esta mudança é atribuída a um aumento no índice de refração local devido ao anticorpo e é o resultado de um aumento no índice de refração local do meio que circunda as AuNPs, como mostrado na linha azul.

Quando o anticorpo conjugado com as AuNPs foi medido, a intensidade da banda LSPR diminuiu e continuou a ser menor do que a das bandas LSPR antes da adição do anticorpo, este comportamento é causado pela interação do anticorpo com as partículas de ouro coloidal. A aglutinação do ouro com o anticorpo IgG reduziu a superfície das nanopartículas, consequentemente a LSPR foi reduzida. Na comparação dos espectros de nanopartículas antes e após a imobilização do anticorpo, houve um deslocamento do pico em 97 nm, isso porque o pico da LSPR aumenta quando as amostras são iluminadas com luz não polarizada.

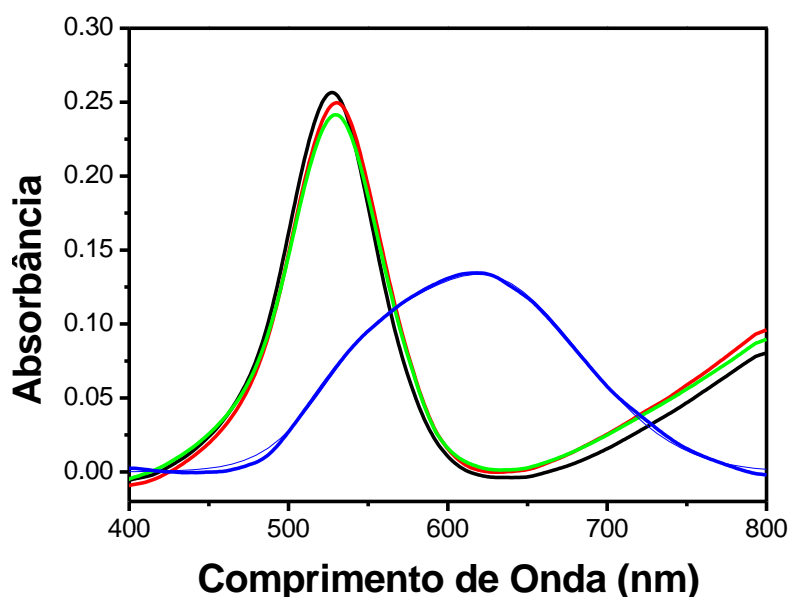


Figura 23: Curvas do UV-Vis obtidas após cada etapa de conjugação. Nanopartículas de ouro (linha preta), nanopartículas modificadas com MUA (linha vermelha), modificação com EDC/NHS (linha verde) e adição do anticorpo (linha azul).

O monitoramento simultâneo das amostras de urinas positivas e negativas é mostrado na figura 24. A figura 24A exibe o processo de modificação das nanopartículas conjugadas com a amostra positiva de urina contendo o vírus CDV. Neste gráfico, a linha preta representa apenas as nanopartículas, a linha vermelha são as nanopartículas modificadas com MUA, a linha verde é a adição do EDC/NHS, a linha azul representa a modificação com o anticorpo apresentando uma absorbância de 0,13 com um comprimento de onda de 616 nm e a linha rosa a adição da amostra positiva com o vírus CDV, demonstrando uma absorbância de 0,08 com um comprimento de onda de 635 nm. Comparando os dois picos podemos observar que houve um decaimento de 0,05 no pico de absorbância e um deslocamento de 19 nm no comprimento de onda, confirmando a ligação antígeno/anticorpo. Esse resultado é devido ao tamanho final da molécula. Desde que ocorreu a ligação antígeno/anticorpo a molécula se tornou muito grande, com aproximadamente 200 nm de diâmetro, ocupando um grande

espaço na solução, fazendo com que a luz do laser a atinja sem dificuldades, sendo assim mais facilmente refletida resultando em um decaimento no valor da absorbância e em um deslocamento no comprimento de onda.

Para o controle negativo, o experimento foi realizado utilizando amostra de urina negativa sem a presença do vírus CDV previamente testada pela técnica RT-qPCR (fig. 24B). Quando comparamos os resultados obtidos do pico do anticorpo (linha azul) com o pico da amostra de urina negativa (linha rosa), ambos apresentam uma absorbância de 0,13 e um comprimento de onda de 616 nm, não havendo assim nenhuma mudança entre as amostras. O não deslocamento no comprimento de onda e não redução do valor da absorbância ocorreu porque não houve a presença do vírus CDV, permitindo assim que a luz do laser atravessasse a amostra sem sofrer muita reflectância sendo menos absorvida. Com esse resultado, nós concluímos que a amostra era negativa. Todas as amostras foram previamente testadas pelas técnicas de RT-qPCR e SPR.

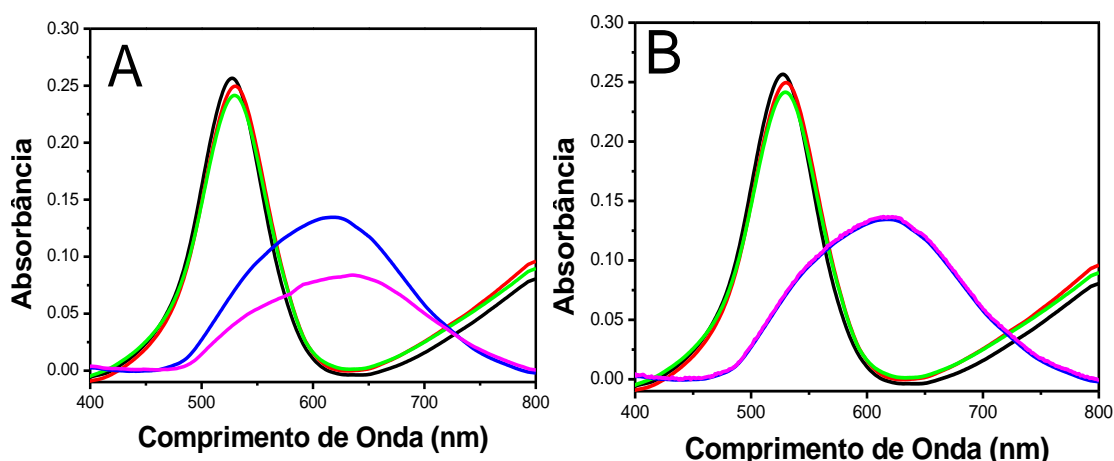


Figura 24: Estudo comparativo entre as amostras positiva e negativa. A) nanopartículas de ouro (linha preta), MUA (linha vermelha), EDC / NHS (linha verde), anticorpo (linha azul) e amostra de urina positiva (linha rosa). B) nanopartículas de ouro (linha preta), MUA (linha vermelha), EDC / NHS (linha verde), anticorpo (linha azul) e amostra de urina negativa (linha rosa).

Todas as etapas do experimento foram caracterizadas utilizando microscopia eletrônica de transmissão (TEM) (fig. 25). Na imagem da figura 25A, estão as nanopartículas de ouro sozinhas, com um diâmetro médio de 26,67 nm. Em seguida, está uma nanopartícula isolada e modificada por MUA e EDC/NHS, apresentando um diâmetro de 48 nm, esta etapa envolve a ativação do grupo tiol (fig. 25B). A figura 25C, mostra a adição do anticorpo que através de ligação covalente das aminas com grupo tiol se fixaram a nanopartícula,

apresentando um diâmetro de 88 nm. Após a interação entre o anticorpo e o vírus CDV, a nanopartícula passou a apresentar um diâmetro de 200 nm (fig. 25D), isso porque o vírus CDV é uma molécula grande, apresentando um diâmetro de 100 à 250 nm. Estes resultados confirmam todo o processo de agregação das nanopartículas na detecção do CDV.

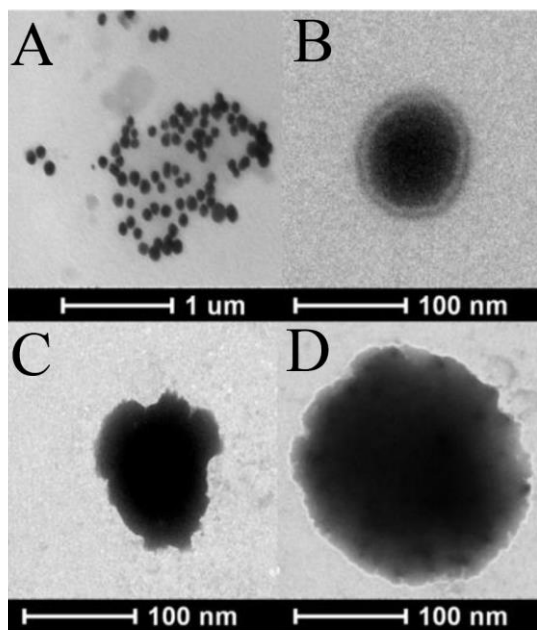


Figura 25: Etapas de modificação das nanopartículas obtidas por MET. Nanopartículas de ouro (A), nanopartícula isolada e modificada pela formação da SAM e EDC/NHS (B), adsorção do anticorpo (C) e ligação com o vírus CDV (D).

Todas as etapas de modificação também foram monitoradas através da técnica colorimétrica, onde foi possível avaliar a eficiência do método. A figura 26 mostra todas as etapas de modificação das nanopartículas. Na cubeta A está a solução contendo apenas AuNPs, apresentando uma coloração vermelha. De acordo com o trabalho de MCFARLAND et al. 2004, esta cor é característica das nanopartículas de ouro. A mudança de cor para o lilás (cubeta B), ocorreu depois da modificação com MUA, EDC/NHS e anticorpo. Nesta etapa, as nanopartículas foram modificadas pela formação das monocamadas auto-organizadas e ativadas com grupos tióis que criaram ligações covalentes com as aminas dos anticorpos. Na cubeta C foi adicionada a amostra de urina positiva contendo o vírus CDV, provocando uma mudança na coloração da solução, que passou de lilás para amarelo. Para confirmar e validar o teste, o controle negativo foi realizado utilizando amostra de urina sem a presença do vírus CDV. Neste teste, após a adição da amostra negativa a solução manteve a mesma coloração lilás, indicando que não houve ligação com o anticorpo (cubeta D). Para confirmar a eficiência do teste colorimétrico, quatro amostras de vírus diferentes sendo eles: ophidian

paramixovírus (OPMV), paramixovírus, parvovírus e vírus Newcastle foram testadas (números 1, 2, 3 e 4). Todo procedimento de modificação e o anticorpo anti-CDV foi o mesmo utilizado, apenas houve a substituição do vírus. O resultado final do teste mostrou que não houve mudança da cor para a tonalidade amarela obtida com a ligação do CDV ao anticorpo específico. Todas as mudanças de coloração obtidas no teste colorimétrico ocorreram em tempo real validando desta forma os resultados obtidos através das técnicas de LSPR e TEM.

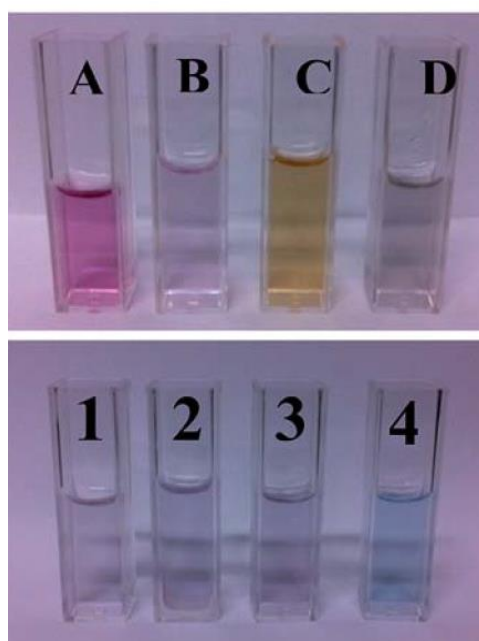


Figura 26: Teste colorimétrico para diferentes tipos de vírus. Nanopartículas de ouro (A), modificação com MUA, EDC/NHS e anticorpo (B), amostra positiva do CDV (C) e amostra negativa (D). Teste de interferência: ophidian paramixovírus (OPMV) (1), parvovírus (2), paramixovírus (3) e vírus Newcastle (4).

Para obter as condições ideais do experimento, foram realizados testes variando as concentrações de anticorpo nas seguintes diluições: 1 mL da amostra de anticorpo para 0,0; 200,0; 500,0 e 1000,0 mL PBS (10 mM pH 7,4) (fig. 27A). Pode-se observar que à medida que a concentração de anticorpo diminui ocorre uma diminuição da absorvância e não ocorre deslocamento no comprimento de onda. Vale a pena notar, que as bandas da LSPR apenas diminuem de intensidade após o evento de reconhecimento entre as nanopartículas e o anticorpo. No entanto, a diminuição na redução da intensidade e o deslocamento para o azul aparecem em concentrações mais elevadas (10 mL de PBS). Esta mudança é mais provável devido à interação entre as nanopartículas de ouro ligadas aos anticorpos, tanto em números

maiores como menores podem ser detectadas devido a mudanças correspondentes nas bandas da LSPR. Resultados similares foram observados no trabalho de Wang e Irudayaraj 2008 para a detecção de *S. typhimurium*. A linha preta mostra a concentração mais baixa de 1/1000 mL de PBS com absorvância de 0,10 e um comprimento de onda de 601 nm; e a linha azul indica a concentração mais elevada de 1/0 mL de PBS com absorvância de 0,06 e o comprimento de onda de 612 nm. Ao compararmos os resultados, é possível notar uma diferença na absorção de 0,04 e 11 nm no comprimento de onda. Resultados semelhantes foram encontrados por Liu et al. 2008, que ao analisar diferentes concentrações de DNA hairpins observou que houve uma diminuição no espectro de absorção e uma pequena mudança no comprimento de onda. Na figura 27B, temos a curva de calibração para o anticorpo. Podemos observar que a intensidade da absorção diminui à medida que ocorre o aumento da concentração do anticorpo e na concentração de 1mL_{amostra} para 200 mL_{PBS} o sistema torna-se saturado. Na inserção, é demonstrada a gama linear de concentração do anticorpo assim como o ajuste linear. As AuNPs demonstraram ser muito sensíveis à presença dos anticorpos, pelo aumento da unidade de concentração do anticorpo a absorvância diminuiu 8,92 unidades.

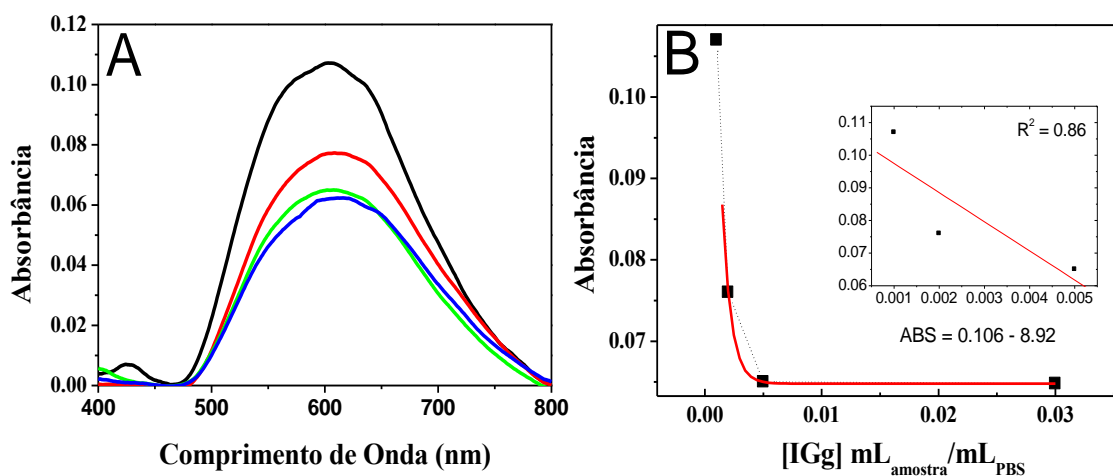


Figura 27: Diluições das concentrações dos anticorpos. A) amostra de anticorpo diluído em 1 mL de 2,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ em 10 mM PBS para 0,0 mL PBS (linha azul), 200,0 mL PBS (linha verde), 500,0 mL PBS (linha vermelha) e 1000,0 mL PBD (linha preta). B) curva de calibração para o IgG. 1mL de IgG x mg mL foram diluídos para 1000, 500, 200 e 0 mL de PBS.

Testes com concentrações variadas do CDV foram realizados nas seguintes proporções: 1 mL da amostra de CDV para 0,0; 20,0; 50,0; 100,0 e 150,0 mL de PBS. Assim como no teste anterior, podemos observar que com o aumento da concentração da amostra, menor foi a sua banda (absorvância). No momento em que diferentes concentrações de

amostras de urinas com vírus CDV foram adicionadas, as AuNPs modificadas com as monocamadas auto-organizadas, além do grupo tiol e do anticorpo reduziu a intensidade da banda LSPR das nanopartículas. Isto é porque o vírus CDV é muito maior em tamanho (~100-250 nm), enquanto que as AuNPs modificados por anticorpo anti-CDV apresentam um tamanho de 88 nm. Isso faz com que várias AuNPs conjugadas com anticorpos sejam atraídas à superfície do vírus CDV. A linha azul indica a concentração mais baixa de 1/150 mL de PBS, apresentando uma absorbância de 0,3 e um comprimento de onda de 572 nm, enquanto que a linha rosa apresenta a concentração de 1/0,0 mL de PBS com a absorbância de 0,1 e um comprimento de onda de 607 nm. Ao compararmos os resultados obtidos, é possível notar uma diferença de 0,2 na absorção e de 35 nm no comprimento de onda (fig. 28). Este resultado é similar ao apresentado por Wang e Irudayaraj, 2008, que ao variarem a concentração da bactéria *E. coli*, observaram que com uma concentração mais elevada da amostra menor era a intensidade da absorbância e ocorria uma dispersão mais elevada devido ao grande número de compostos presentes na amostra.

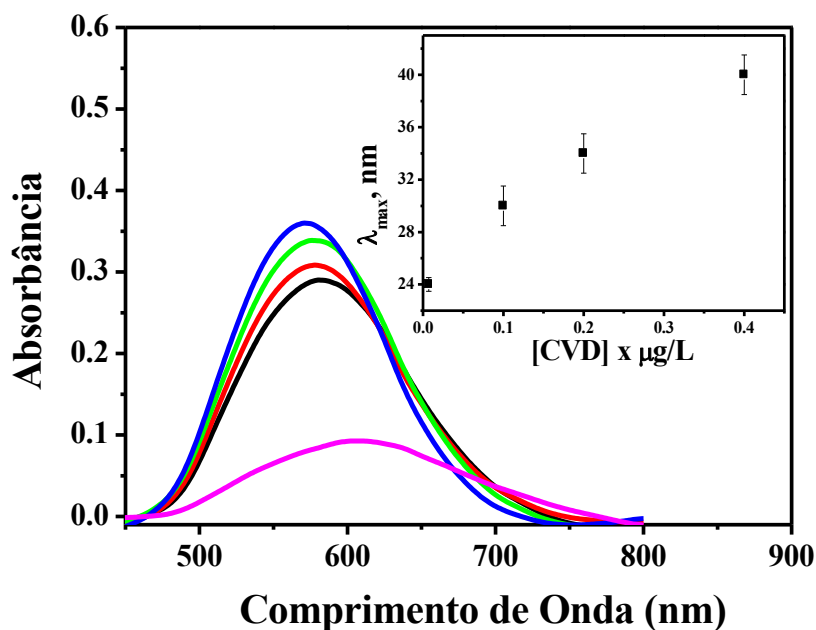


Figura 28: Variações das concentrações de CDV. (A) amostra de CDV diluída em 1 mL de 100,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ em 10 mM PBS para 0,0 mL PBS (linha rosa), 20,0 mL PBS (linha preta), 50,0 mL PBS (linha vermelha), 100,0 mL PBS (linha verde) e 150,0 mL PBS (linha azul). (B) curva de calibração para CDV.

5 CONCLUSÃO

Neste trabalho, nós demonstramos a detecção do vírus da cinomose canina através de ressonância plasmônica de superfície (SPR) associada com outras técnicas, como: eletroquímica, ressonância plasmônica de superfície localizada (LSPR) e colorimetria. A SPR mostrou ser uma poderosa ferramenta analítica, permitindo realizar análises cinéticas de todo processo de adsorção e dessorção do CDV ao anticorpo em tempo real, tornando possível a detecção do vírus em diferentes amostras de urinas. O limite de detecção para esta técnica foi de $0,1 \text{ ng L}^{-1}$, com frequência de análise de 15 amostras por dia. A associação com a técnica eletroquímica permitiu avaliar os problemas associados com a metodologia de imobilização. A etapa seguinte do trabalho demonstrou que a utilização da proteína A como molécula intermediária para orientação dos anticorpos foi bem sucedida, uma vez que o limite de detecção para o CDV foi de $0,1 \text{ ng mL}^{-1}$ com a proteína A e de $2,5 \text{ ng L}^{-1}$ sem a proteína, com desvio padrão relativo de 4,7%. O monitoramento e a caracterização do CDV através da técnica de LSPR confirmaram todos os resultados obtidos anteriormente. Através do teste colorimétrico, conseguimos desenvolver uma nova metodologia para diagnóstico do CDV que apresentou alta eficiência, baixo custo de análise e um pequeno tempo para obtenção dos resultados. Todas as metodologias propostas demonstraram que a cinomose canina foi detectada em quase 100% das amostras analisadas.

REFERÊNCIAS

- 1- AMUDE, A. M.; ALFIERI, A. A.; ALFIERI, A. F. Ante mortem diagnosis of CDV infection by RT-PCR in distemper dogs with neurological deficits without the typical clinical presentation. **Veterinary Research Communications**, v. 30, n. 6, p. 679-87, 2006.
- 2- AMUDE, A. M.; ALFIERI, A. A.; ALFIERI, A. F. Clinico pathological findings in dogs with distemper encephalomyelitis presented without characteristic signs of the disease. **Research in Veterinary Science**, n. 82, 2007.
- 3- ANDREWES, C. H.; PEREIRA, H. G.; PORTERFIELD, J. S. **Andrewes' Viruses of Vertebrates**. 5.ed. Baillière Tindall: London, 1989.
- 4- APPEL, M. J. G.; SUMMERS, B. A. Recent advances in canine infectious diseases. **Int. Vet. Inf. Serv**, p. 1199, 1999.
- 5- ARNS, C.W.; SPILKI, F.R.; ALMEIDA, R.S. Paramixoviridae In: FLORES. **Virologia Veterinária**, p.399-412, 2007.
- 6- BARBOSA, J. M.; PASSOS, R. F. B. Análise dos casos de cinomose no H.V. São Francisco de Assis da faculdade Latino Americana-Anápolis-GO. **Ensaio e Ciência**, v. 12, p. 139-150, 2008.
- 7- BEINEKE, A.; PUFF, C.; SEEHUSEN, F.; BAUMGARTNER, W. Pathogenesis and immunopathology of systemic and nervous canine distemper. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 127, n. 2, p. 1-18, 2009.
- 8- Biacore Assay Handbook 29-0194-00 Edition AA. **General Electric Company** (2012)
- 9- BIAZZONO, L.; HAGIWARA, M. K.; CORRÊA, A. R. Avaliação da resposta imune humoral em cães jovens imunizados contra a cinomose com vacina de vírus atenuado. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, v. 38, n. 5, p. 245-250, 2001.
- 10- BRECHT, A.; GAUGLITZ, G. Optical Probes and Transducers. **Biosens. Bioelectron**, v. 10, p. 923, 1995.
- 11- BUCHEN-OSMONS, C. Taxonomy and classification of viruses. In: Murray, P. R. et al. **Manual of Clinical Microbiology**. 8.ed. ASM Press: Washington, 2003.
- 12- CARVALHO, O. V.; BOTELHO, C. V.; FERREIRA, C. G. T.; SCHERER, O. P.; SOARES-MARTINS, J. A. P.; ALMEIDA, R. M.; JUNIOR, S.A. Immunopathogenic and Neurological Mechanisms of Canine Distemper Virus. **Advances in Virology**, v. 2012, 2012.
- 13- CARVALHO, R. M.; RATH, S.; KUBOTA, L. T. SPR- Uma ferramenta para biossensores. **Quim. Nova**, v. 26, n. 1, p. 97-104, 2003.
- 14- CHEN, L.; WANG, Q.; WANGUO HOU, W. The utilization of BSA-modified chip on the investigation of ligand/protein interaction with surface plasmon resonance. **Afr. J. Biotechnol**, v. 8, p. 7148-7155, 2009.
- 15- CHETCUTI, A. F.; WONG, D. K. Y.; STUART, M. C. An indirect perfluorosulfonated ionomer-coated electrochemical immunosensor for the detection of the protein human chorionic gonadotrophin. **Anal. Chem**, v. 71, p. 4088, 1999.

- 16- CORRÊA W. M.; CORRÊA C. N. M. *Enfermidades Infecciosas dos Mamíferos Domésticos*. 2ªed, **MEDSI**, Rio de Janeiro, p. 202, 1992.
- 17- COUTURE, M. M.; ZHAOWA, S. S.; MASSON, J. F. Modern surface plasmon resonance for bioanalytics and biophysics. **Phys. Chem. Chem. Phys**, v. 15, p. 11190, 2013.
- 18- D' AGATA, R.; SPOTO, G. Surface plasmon resonance imaging for nucleic acid detection. **Anal. Bioanal Chem.**, v. 405, p. 573-584, 2013.
- 19- DAMOS, F. S.; MENDES, R. K.; KUBOTA, L. T. Applications of QCM, EIS and SPR in the investigation of surfaces and interfaces for the development of (BIO) sensors. **Química Nova**, v. 27, n. 6, p. 970-979, 2004.
- 20- DASZAK, P.; CUNNINGHAM, A. A.; HYATT, A. D. Emerging infectious diseases of wildlife: threats to biodiversity and human health. **Science**, v. 287, p. 443– 449, 2000.
- 21- DE MOL, N. J.; FISCHER, M. J. E. **MANUAL AUTOLAB**, pp. 1-64.
- 22- ELIA, G.; DECARO, N.; MARTELLA, V.; CIRONE, F.; LUCENTE, M. S.; LORUSSO, E.; TRANI, L.; BUONAVOGLIA, C. Detection of canine distemper virus in dogs by real-time RT-PCR. **Journal of Virol. Methods**, v. 36, n.1-2, p.171-6. 2006.
- 23- FANG, X.; Tan, O. K.; Tse, M. S.; Ooi, E. E. A label-free immunosensors for diagnosis of dengue infection with simple electrical measurements. **Biosens. Bioelectron**, v. 25, p. 1137-1142, 2010.
- 24- FATEBELLO-FILHO, O.; CAPELATO, M. D. Biossensores. **Química Nova**, v. 15, p. 1992, 1992.
- 25- FRISK, A. L.; KONIG, M.; MORITIZ, A.; BAUMGARTNER, W. Detection of Canine Distemper Virus Nucleoprotein RNA by Reverse Transcription-PCR Using Serum, Whole Blood, and Cerebrospinal Fluid from Dogs with Distemper. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 11, p. 3634-3643, 1999.
- 26- GEBARA, C. M. S.; WOSIACKI, S. R.; NEGRA, O. F. J.; OLIVEIRA, D. B.; BELONI, S. N. E.; ALFIERI, A. A.; ALFIERI, A. F. Detecção do gene da nucleoproteína do vírus da cinomose canina por RT-PCR em urina de cães com sinais clínicos de cinomose. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** v. 56, p. 480–487, 2004.
- 27- GERMAN, N.; MINKSTIMINE, A. K.; KIRLYTE, J.; MAKARAVICIUTE, A.; RAMANAVICIUS, A.; MIKOLIUNAITE, L.; RAMANAVICIUS, A. Determination of antibodies against human growth hormone using a direct immunoassay format and different electrochemical methods. **Analyst**, v. 138, n. 5, p. 1427-1433, 2013.
- 28- GREENE, C. E.; VANDEVELDE, M. **Canine Distemper. In: GREENE, C.E. Infectious Diseases of the Dog and Cat**. 40 ED. Elsevier: Missouri, 2012.
- 29- GREENE, G. E.; APPEL, M. J. **Canine distemper. In: Infectious diseases of dog and the cat**. 2. ed. W. B. Sundess: Philadelphia, 1998.
- 30- GRIESHABER, D.; MACKENZIE, R.; VOROS, J.; REIMHULT, E. Electrochemical Biosensors - Sensor Principles and Architectures. **Sensors**, v. 8, p. 1400-1458, 2008.

- 31- GRIOT-WENK, M. E.; CHERPILLOD, P.; KOCH, A.; ZURBRIGGEN, R.; BRUCKNER, L.; WITTEK, R.; ZURBRIGGEN, A. The humoral immune response to recombinant nucleocapsid antigen of canine distemper virus in dogs vaccinated with attenuated distemper virus or DNA encoding the nucleocapsid of wild-type virus. **Journal of Veterinary Medicine**, v. 48, p. 295, 2001.
- 32- HATMANN, T. L. S. **Anticorpos neutralizantes contra o vírus da cinomose e parainfluenza caninos em cães e felinos silvestres em cativeiro**. 2006. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2006.
- 33- HEALY, D. A.; HAYES, C. J.; LEONARD, P.; MCKENNA, L.; O'KENNEDY, R. Biosensor developments: application to prostate-specific antigen detection. **Trends in Biotechnology**, v. 25, n. 3, 2007.
- 34- IWASAKI, T.; HORIUCHI, T.; MORITA, M.; NIWA, O. **Sens. Actuators, B.**, v. 50, p. 145, 1998.
- 35- JENSEN, T. R. et al. Nanosphere Lithography: Tunable Localized Surface Plasmon Resonance Spectra of Silver Nanoparticles. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 104, n. 45, p. 10549–10556, 2000.
- 36- JOZWIK, A.; FRYMUS, T. Comparison of the immunofluorescence assay with RT-PCR and nested PCR in the diagnosis of canine distemper. **Vet. Res. Commun.**, v. 29, p. 347-359, 2005.
- 37- KASEMO, B. Biological Surface Science. **Surface Science**, v. 500, p. 656-677, 2002.
- 38- KATAYAMA, H.; SHIMASAKI, A.; OHGAKI, S. Development of a virus concentration method and its application to detection of enterovirus and Norwalk virus from coastal seawater. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 68, p. 1033-1039, 2002.
- 39- KIM, Y. H.; CHO, K. W.; YOUN, H. Y.; YOO, H.S.; HAN, H.R. detection of canine distemper virus (CDV) through one step rt-pcr combined with nested pcr. **Journal of Veterinary Science**, v. 1, p. 59-63, 2001.
- 40- KOUBOVÁ, V.; BRYNDA, E.; KARASOVA, L.; SKVOR, J.; HOMOLA, J.; DOSTALEK, J.; TOBISKA, P.; ROSICKY, J. Detection of foodborne pathogens using surface plasmon resonance biosensors. **Sensors and Actuators**, v. 74, p. 100-105, 2001.
- 41- LAMB, R. A., KOLAKOFSKY, D. Paramyxoviridae: The viruses and their replication. **In Fields Virology**. 4 ed. Lippincott–Raven: Philadelphia, 2001.
- 42- LIU, G.; WAN, Y.; GAU, V.; ZHANG, J.; WANG, L.; SONG, S.; FAN, C. An enzyme-based E-DNA sensor for sequence-specific detection of femtomolar DNA targets. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 130, p. 6820-6825, 2008.
- 43- LOJOU, É.; BIANCO, P. (2006). Application of the electrochemical concepts and techniques to amperometric biosensor devices. **J. Electroceram**, v. 16, p. 79-91, 2006.
- 44- LÚCIO, E. C.; PIMENTEL, J. L.; CLEMENTE, S. M. S.; MACHADO, A. C.; OLIVEIRA, J. M. B.; BRANDESPIM, D. F.; SILVA JÚNIOR, J. L.; PINHEIRO JÚNIOR, J. W. Análise epidemiológica da infecção pelo vírus da cinomose, em cães do município de Garanhuns, Pernambuco, Brasil. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 35, n. 3, p. 1323-1330, 2014.

- 45- MALHOTRA, B. D.; CHAUBEY, A. Biosensors for clinical diagnostics industry. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 91, p. 117-127, 2003.
- 46- MARTELLA, V.; CIRONE, F.; ELIA, G.; LORUSSO, E.; DECARO, N.; CAMPOLO, M.; DESARIO, C.; LUCENTE, M. S.; BELLACICCO, A. L.; BLIXENKRONE-MOLLER, M.; CARMICHAEL, L. E.; BUONAVOGLIA, C. Heterogeneity within the hemagglutinin genes of canine distemper virus (CDV) strains detected in Italy. **Veterinary Microbiology**, v. 116, n. 4, p. 301-9, 2006.
- 47- MCFARLAND, A. D. et al. Color My Nanoworld. **Journal of Chemical Education**, v. 81, n. 4, p. 544, 2004.
- 48- MENDES, R. K. **Investigação dos efeitos dos procedimentos de imobilização em monocamadas auto-organizadas da enzima peroxidase no desenvolvimento de um biossensor**. 2006 Tese (Doutorado em Química), Universidade Estadual de Campinas, Brasil, 2006.
- 49- MESSLING, V. V.; ZIMMER, G.; HERRLER, G.; HAAS, L.; CATTANEO, R. The Hemagglutinin of Canine Distemper Virus Determines Tropism and Cytopathogenicity. **J Virol. Jul**, v. 75, n. 14, p. 6418–6427, 2001.
- 50- MINKSTIMIENE, K. A.; RAMANAVICIENE, A.; KIRLYTE, J.; RAMANAVICIUS, A. Comparative study of random and oriented antibody immobilization techniques on the binding capacity of immunosensor. **Anal Chem**, v. 15, p. 6401-6408, 2010.
- 51- MOCHIZUKI, M.; HASHIMOTO, M.; HAGIWARA, S.; YOSHIDA, Y.; ISHIGURO, S. Genotypes of Canine Distemper Virus Determined by Analysis of the Hemagglutinin Genes of Recent Isolates from Dogs in Japan. **J. Clin. Microbiol**, v. 37, n. 9, p. 2936–2942, 1999.
- 52- NAKATANI, K.; SANDO, S.; DAITO, I. Scanning of guanine-guanine mismatches in DNA by synthetic ligands using surface plasmon resonance. **Nature Biotechnology**, v. 19, p. 51-55, 2001.
- 53- OLIVEIRA, C. P. **Desenvolvimento de uma camada de reconhecimento biológico de ligação universal para utilização em imunoenaios**. 2013 Dissertação (Mestrado em Engenharia Química), Instituto Superior Técnico Lisboa, Portugal, 2013.
- 54- OLIVEIRA, M. D. L.; CORREA, M. T. S.; COELHO, L. C. B. B.; DINIZ, F. B. Electrochemical evaluation of lectin-sugar interaction on gold electrode modified with colloidal gold and polyvinyl butyral. **Colloids and Surfaces B**, v. 66, p. 13-19, 2008.
- 55- PATSKOVSKY, S.; KABASHIN, A. V.; MEUNIER, M.; LUONG, J. H. T. Near-infrared surface plasmon resonance sensing on a silicon platform. **Science Direct**, v. 97, p. 409-414, 2004.
- 56- PATTNAIK, P. Surface plasmon resonance: applications in understanding receptor-ligand interaction. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 126, p. 79-92, 2005.
- 57- RICCARDI, C.; COSTA, P.; YAMANAKA, H. Imunossensor Amperométrico. **Química Nova**, v. 25, n. 2, 2002.
- 58- RZEZUTKA, A.; MIZAK, B. Application of N-PCR for diagnosis of distemper in dogs and fur animals. **Veterinary Microbiology**, v. 88, n.1, p.95-103, 2002.

- 59- SAITO, T. B.; ALFIERI, A. A.; WOSIACKI, S. R., NEGRÃO, F. J.; MORAIS, H. S. A.; ALFIERI, A. A. Detection of canine distemper virus by reverse transcriptase-polymerase chain reaction in the urine of dogs with clinical signs of distemper encephalitis. **Research in Veterinary Science**, v. 80, p. 116-119, 2006.
- 60- SANTOS, B. L. **Imobilização de enzimas para biocatalizadores**. 2013 Dissertação (Mestrado em Biologia Geral e Aplicada), Universidade Estadual Paulista, Brasil, 2013.
- 61- SANTOS, N.; ALMENDRA, C.; TAVARES, L. Serologic survey for canine distemper virus and canine parvovirus in free-ranging wild carnivores from Portugal. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 45, n. 1, p. 221-226, 2009.
- 62- SCARANO, S.; MASCINI, M.; TURNER, A. P. F.; MINUNNI, M. Surface plasmon resonance imaging for affinity-based biosensors. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 25, p. 957-966, 2010.
- 63- SCHMIDT, P.; HAFNER, A.; REUBEL, G. H.; WANKE, R.; FRANKE, V.; LÖSCH, U.; DAHME, E. Production of antibodies to canine distemper virus in chicken eggs for immunochemistry. **Journal. Vet. Med.**, v. 36, p. 661–668, 1989.
- 64- SILVA, C. R.; SILVA, R. C.; VIANA, D. L. **Dicionário Ilustrado de saúde**. 4 ed. Yendis: São Caetano do Sul, 2009.
- 65- SILVA, M. C.; FIGHERA, R. A.; BRUM, J. S.; GRAÇA, D. L.; KOMMERS, G. D.; IRIGOYEN, L. F.; BARROS, C. S. L. Aspectos clínico patológicos de 620 casos neurológicos de cinomose em cães. **Pesq. Vet. Bras**, v. 27, n. 5, p. 215-220, 2007.
- 66- SIXT, N.; CARDOSO, A.; VALLIER, A.; FAYOLLE, J.; BUCKLAND, R.; WILD, T. F. Canine distemper virus DNA vaccination induces humoral and cellular immunity and protects against a lethal intracerebral challenge. **Journal of Virology**, v. 72, p. 8472-8476, 1998.
- 67- SOLANKI, R. R.; PRABHAKAR, N.; PANDEY, M. K.; MALHOTRA, B. D. Self-assembled monolayer for toxicant detection using nucleic acid sensor based on surface plasmon resonance technique. **Biomed Microdevices**, v. 10, p. 757-765, 2008.
- 68- SONG, H. Y.; ZHOU, X.; HOBLEY, J.; SU, X. Comparative Study of Random and Oriented Antibody Immobilization as Measured by Dual Polarization Interferometry and Surface Plasmon Resonance Spectroscopy. **Langmuir**, v. 28, p. 997-1004, 2012.
- 69- TOZATO, C. C. **Aplicação de conjugado de microesferas de poliestireno para preparo de RNA no diagnóstico da cinomose canina por RT-qPCR**. 2014. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária), Universidade Estadual Paulista, Brasil, 2014.
- 70- VIDIC, J.; CHEVALIER, C.; GOFFIC, R. L.; MIODEK, A.; BOURDIEU, C.; RICHARD, C. A.; MOUDJOU, M.; DELMAS, B. Surface Plasmon Resonance Immunosensor for Detection of PB1-F2 Influenza A Virus Protein in Infected Biological Samples. **Journal of Analytical & Bioanalytical Techniques**, p. 1-7, 2013.
- 71- WANG, C.; IRUDAYARAJ, J. Gold Nanorod Probes for the Detection of Multiple Pathogens. **Small**, v. 12, p. 2204-2208, 2008.
- 72- WANG, Y.; KNOLL, W.; DOSTALEK, J. Bacterial pathogen surface plasmon resonance biosensor advanced by long range surface plasmons and magnetic nanoparticle assays. **Anal. Chemistry**, v. 84, p. 8345-8350, 2012.

- 73- WILLETS, K. A; VAN DUYN, R. P. Localized surface plasmon resonance spectroscopy and sensing. **Annual Review of Physical Chemistry**, v. 58, p. 267–97, 2007.
- 74- www.bionavis.com/technology/spr/. Acesso em: 12 de novembro de 2014.
- 75- YANASE, Y.; HIRAGUN, T.; ISHII, K.; KAWAGUCHI, T.; YANASE, T.; KAWAI, M.; SAKAMOTO, K.; HIDE, M. Surface plasmon resonance for cell-based clinical diagnosis. **Sensors**, v. 14, p. 4948-4959, 2014.
- 76- YANG, Y.; WANG, Q.; GUO, D. A novel strategy for analyzing RNA-Protein Interactions by surface plasmon resonance biosensor. **Springer Link**, p. 1-14, 2008.
- 77- ZHANG, S.; YANG, W.; NIU, Y.; SUN, C. Multilayered construction of glucose oxidase and poly (allylamine) ferrocene on gold electrodes by means of layer-by-layer covalent attachment. **Sensors & Actuators**, v. 101, p. 387-393, 2004.
- 78- ZHANG, S.; WRIGHT, G.; YANG, Y. Materials and techniques for electrochemical biosensor design and construction. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 15, p. 273- 282, 2000.