

Desenvolvimento de testes eletroquímicos para a detecção de Leishmania

Luana dos Santos Perroni Mariotti¹, Noemí Angelica Vieira Roza¹, Talita Mazon¹

luana.mariotti1105@gmail.com, noemi.roza@cti.gov.br,
talita.mazon@cti.gov.br

**¹Divisão de Infraestrutura para Nano e Microssistemas- DINAM
CTI/MCTI Renato Archer – Campinas/SP**

Resumo. Diversas tecnologias têm sido desenvolvidas na área da saúde para fins de diagnóstico. O fomento ao desenvolvimento de biossensores baseados em nanotecnologia, apresenta a perspectiva de uso de uma ferramenta de baixo custo e resposta de alta velocidade, sendo eficaz para o diagnóstico e tratamento de doenças. Uma zoonose infecciosa e de difícil diagnóstico, a leishmaniose, apresenta alta mortalidade quando não diagnosticada a tempo para o tratamento efetivo, fazendo com que o uso de ferramentas para a identificação do patógeno seja de extrema importância, viabilizando a utilização de novos marcadores bioquímicos que possam ampliar o repertório terapêutico empregado em benefício dos indivíduos acometidos.

Abstract. Several technologies have been developed in the health sector for diagnostic purposes. Promoting the development of biosensors based on nanotechnology presents the prospect of using a low-cost, high-speed response tool, which is effective for diagnosing and treating diseases. Leishmaniasis, an infectious zoonosis that is difficult to diagnose, has a high mortality rate when not diagnosed in time for effective treatment, making the use of tools to identify the pathogen extremely important, enabling the use of new biochemical markers that can expand the therapeutic repertoire used for the benefit of affected individuals.

1. INTRODUÇÃO

Mathers, Ezzati e Lopez (2007), destacam a relevância da mensuração do impacto das doenças tropicais negligenciadas, como a leishmaniose, causada por protozoários do gênero *Leishmania*, representando a segunda maior causa de morte por parasitas no mundo depois da malária. No Brasil, a leishmaniose é predominantemente causada pela espécie *Leishmania (Viannia) braziliensis*, com cerca de 30.000 novos casos reportados anualmente. A infecção por *L. braziliensis* manifesta-se em um espectro de formas clínicas, incluindo a leishmaniose cutânea, (Magalhães et al., 2021).

Tradicionalmente, o diagnóstico da leishmaniose depende de técnicas como o exame parasitológico, a cultura de tecido e os testes sorológicos. No entanto, essas abordagens apresentam limitações significativas, como custos elevados, necessidade de infraestrutura laboratorial sofisticada e longos tempos de processamento (Brito et al., 2019). Nesse contexto, avanços na nanotecnologia e na bioengenharia têm impulsionado o desenvolvimento de biossensores, dispositivos analíticos inovadores que oferecem uma alternativa promissora para o diagnóstico rápido, sensível e acessível de doenças infecciosas (Silva; Santos, 2021; Medeiros et al., 2020).

A fim de promover uma forma de diagnóstico rápida, barata e eficiente, o presente trabalho visou o desenvolvimento de um biosensor para a detecção de leishmania.

2.MATERIAIS E MÉTODOS

PREPARAÇÃO DOS SENSORES PARA DETECÇÃO DE LEISHMANIA

As bases sensoras foram lavadas com detergente Extran 3% e inseridas no banho de ultrassom durante 180 segundos, depois foi feita limpeza com água deionizada (resistividade de 18,25 MΩ) - também no banho de ultrassom, seguida por lavagem com etanol (C_2H_6O). Os sensores foram imersos em uma placa de petri contendo metanol (CH_3OH) durante 10 minutos e depois em banho por imersão com hidróxido de sódio ($NaOH$ 0,1M) com secagem no fluxo de nitrogênio (N_2). Posteriormente foi adicionada a tinta de prata ao eletrodo de referência com secagem em estufa a 90° graus durante 10 minutos.

O próximo passo consistiu em efetuar as modificações no WE (eletrodo de trabalho) com o objetivo de funcionalizar a superfície para melhor adesão das biomoléculas adicionadas. Primeiramente foi adicionada a cistamina (5mM) com tempo de incubação de 2 horas à temperatura ambiente, com posterior lavagem com tampão fosfato (PBS 1X), pH 7.4. Em seguida, foi adicionado o glutaraldeído 2,5% por 45 minutos, também à temperatura ambiente, seguido por lavagem com PBS 1X.

IMOBILIZAÇÃO DO ANTICORPO ANTI-LEISHMANIA

Na sequência, foi feita a adição do antígeno, que neste caso, é uma cultura de células positivas para leishmania (1:10) com incubação por 1 hora em estufa a 37°C. Foi realizada a etapa de bloqueio com BSA 1% (albumina do soro bovino) por 30 minutos, e a detecção foi realizada adicionando-se anticorpo anti leishmania em duas concentrações diferentes (1:100 e 1:1000).

CARACTERIZAÇÃO ELETROQUÍMICA

As medições eletroquímicas foram realizadas usando um potenciómetro portátil modelo Sensit Smart (PalmSens®) conectado via USB a um computador. Durante os ensaios de voltametria cíclica (VC), o potencial foi de $-0,6$ a $0,6$ V com taxa de varredura de 100 mV s^{-1} registrada em $10\text{ mmol L}^{-1}\text{ K4[Fe(CN)}_6]$ e $0,5\text{ mol L}^{-1}$ com solução de KCl 0,1M como mediador. A voltametria de pulso (DPV) foi realizada para monitorar a preparação do imunossensor.

ESPECIFICIDADE DO IMUNOSENSOR

A especificidade da ligação anticorpo-antígeno foi testada por ensaio de Dot Blot. A proteína recombinante de leishmaniose foi caracterizada após adição de 2ul a uma membrana de nitrocelulose em incubação com anticorpo anti-leishmania.

3.RESULTADOS OBTIDOS

Através deste estudo, foi possível demonstrar a viabilidade e eficácia dos testes eletroquímicos como uma ferramenta promissora para a detecção da leishmania utilizando os biossensores. Os resultados obtidos ressaltam a importância da inovação tecnológica na área da saúde, possibilitando um diagnóstico mais rápido e preciso da doença.

Com os resultados obtidos nos testes de dot blot (Figura 1), foi possível observar a boa seletividade dos anticorpos de leishmania (anti-L. major e anti-L. LPG).

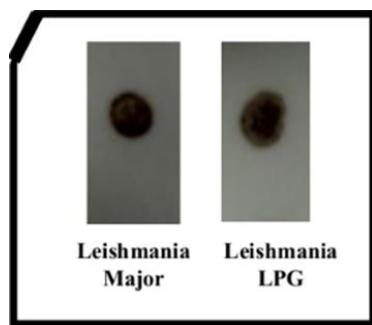


Figura 1 - Dot Blot para leishmania com anticorpos anti-L. major e anti-L. LPG.

As medidas eletroquímicas realizadas em base sensora comercial com um eletrodo de ouro mostraram que houve a detecção do anticorpo de leishmania após a incubação com o antígeno (cultura de células positivas para leishmania). A figura 2 mostra as medidas de VC e DPV das bases apenas com ouro e demais com os outros testes eletroquímicos nos quais as medições de VC e DPV foram feitas, comparando as diferentes bases sensores comerciais, com maior sensibilidade na base sensora de ouro. Na figura 3 estão os resultados das medidas após a incubação com o antígeno de leishmania e na figura 4, após a detecção com o anticorpo anti-leishmania na concentração de 1:100.

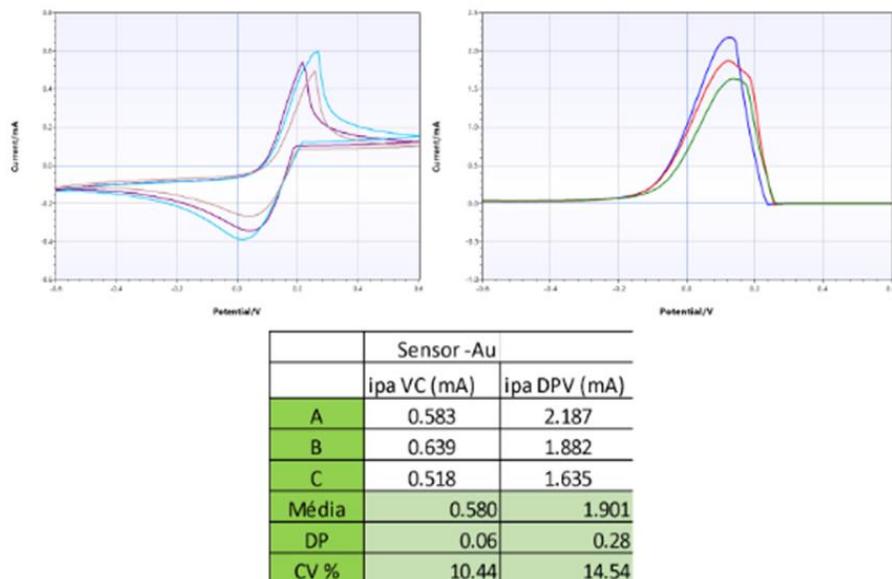


Figura 2 - VCs e DPVs obtidos para diferentes bases de ouro.

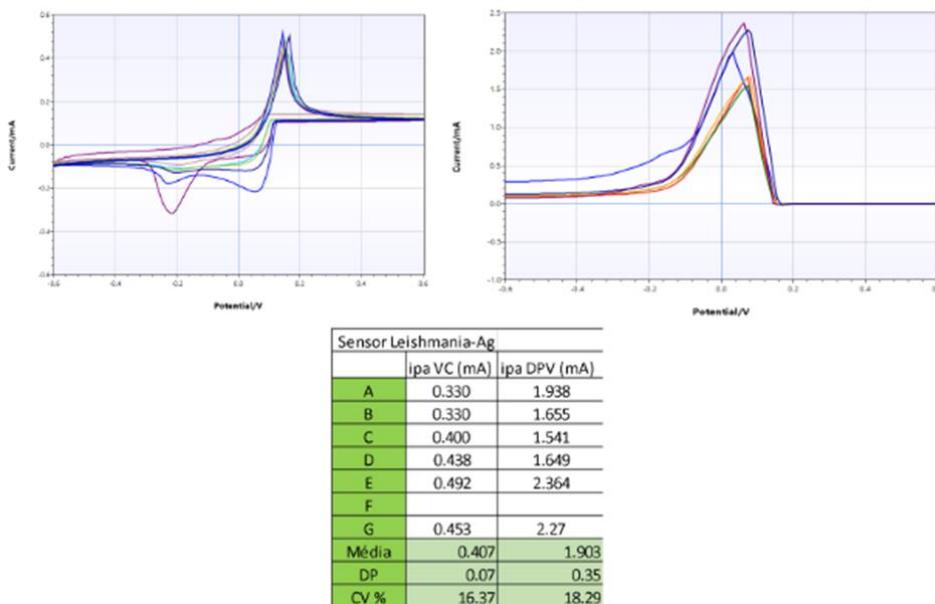


Figura 3 - VCs e DPVs obtidos para diferentes bases sensoras incubadas com antígeno de leishmania.

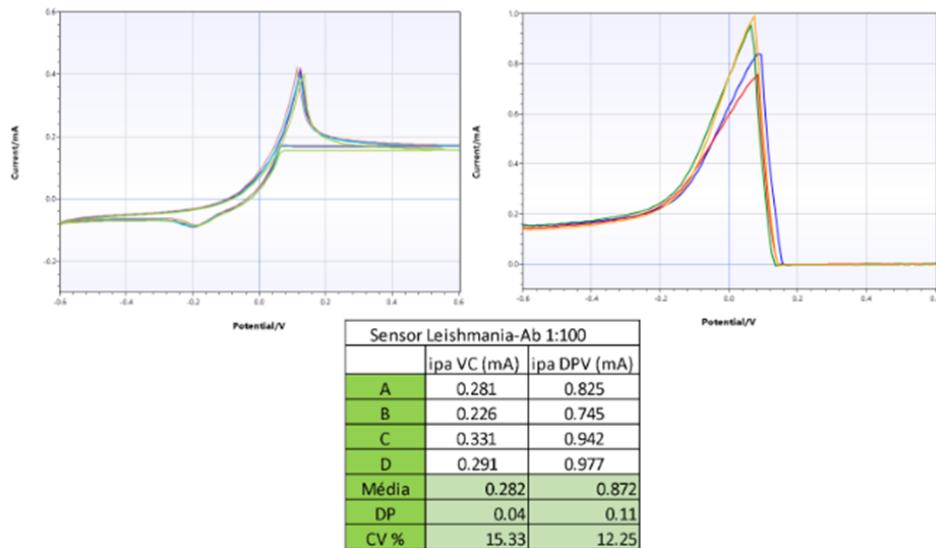


Figura 4 - VCs e DPVs obtidos para diferentes bases sensoras com anticorpo anti-leishmania (1:100).

4.CONCLUSÕES

A aplicação prática dessa descoberta tem impacto positivo na saúde pública, fornecendo uma alternativa eficiente e de fácil aplicabilidade para a população como um todo. Ainda

mais no âmbito de comunidades carentes, que muitas vezes não têm acesso à informação e muito menos a postos de saúde e/ou hospitais. A otimização do sistema de saúde público pode crescer em diversos aspectos no que se diz respeito à implementação da tecnologia de forma facilitada e barata. Visando uma perspectiva futura da aplicação de métodos tecnológicos como a utilização de biossensores para a detecção de doenças negligenciadas em comunidades carentes, o desenvolvimento deste biossensor se faz extremamente relevante.

5.REFERÊNCIAS

Brito, M. A.; Oliveira, R. T.; Carvalho, J. R. Diagnóstico convencional da leishmaniose: limitações e perspectivas. *Revista Brasileira de Parasitologia*, v. 28, n. 3, p. 213-220, 2019.

Brasil, Ministério da Saúde, 2021. Sinan/SVSA/MS. Casos de leishmaniose tegumentar. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 2000 a 2022. Disponível em <<https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/l/t/situacao-epidemiologica/arquivos/l-t-casos.pdf>>. Acesso em agosto de 2024.

Magalhães, A.; Carvalho, L. P.; Costa, R.; Pita, M. S.; Cardoso, T. M.; Machado, P. R. L.; Carvalho, E. M.; Arruda, S.; Carvalho, A. M. Anti-Leishmania IgG is a marker of disseminated leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis*. *International Journal of Infectious Diseases*, v. 106, p. 83-90, maio 2021. DOI: 10.1016/j.ijid.2021.02.016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2021.02.016>.

Mathers, C. D.; Ezzati, M.; Lopez, A. D. Measuring the burden of neglected tropical diseases: the global burden of disease framework. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 1, n. 2, p. e114, 7 nov. 2007. DOI: 10.1371/journal.pntd.0000114. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0000114>.

Medeiros, A. L.; Pereira, J. C.; Almeida, S. A. Biossensores e suas aplicações no diagnóstico de doenças infecciosas. *International Journal of Biomedical Engineering*, v. 45, n. 1, p. 67-78, 2020.

Silva, F. M.; Santos, L. R. Aplicações da nanotecnologia no diagnóstico de doenças negligenciadas. *Journal of Nanotechnology*, v. 12, n. 2, p. 98-110, 2021.