



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

INGRIDI DE SOUZA SENE

**TESTE RÁPIDO PARA DETECÇÃO DA INTERLEUCINA 6 E  
IDENTIFICAÇÃO DE PACIENTES COM LEISHMANIOSE VISCERAL  
GRAVE**

TERESINA

2018

INGRIDI DE SOUZA SENE

**TESTE RÁPIDO PARA DETECÇÃO DA INTERLEUCINA 6 E  
IDENTIFICAÇÃO DE PACIENTES COM LEISHMANIOSE VISCERAL  
GRAVE**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde da REDE NORDESTE DE BIOTECNOLOGIA como requisito para obtenção do título de Doutora em Biotecnologia.

**Orientador:** Prof<sup>o</sup>. Dr. Carlos Henrique Nery Costa

**Co-orientadora:** Prof<sup>a</sup>. Dra. Carla Eiras

TERESINA

2018

FICHA CATALOGRÁFICA

Serviço de Processamento Técnico da Universidade Federal do Piauí  
Biblioteca Comunitária Jornalista Carlos Castello Branco

S475t Sene, Ingridi de Souza.  
- Teste rápido para detecção da interleucina 6 e identificação de pacientes com Leishmaniose visceral grave / Ingridi de Souza Sene. – 2018.  
164 f.  
  
Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Universidade Federal do Piauí, Rede Nordeste de Biotecnologia, Teresina, 2018.  
“Orientador: Prof. Dr. Carlos Henrique Nery Costa”.  
“Coorientadora: Profª. Drª. Carla Eiras”  
  
1. Biotecnologia. 2. Leishmaniose visceral. 3. Interleucina 6.  
4. Teste rápido. I. Título.

CDD 660.6

## FOLHA DE APROVAÇÃO – DEFESA DE TESE

**ALUNA:** INGRIDI DE SOUZA SENE

**TÍTULO DO PROJETO:** “TESTE RÁPIDO PARA DETECÇÃO DA INTERLEUCINA 6 E IDENTIFICAÇÃO DE PACIENTES COM LEISHMANIOSE VISCERAL GRAVE”.

**PROFESSOR ORIENTADOR:** Prof. Dr. Carlos Henrique Nery Costa

**BANCA EXAMINADORA:**

**CONCEITO**

**ASSINATURA**

Prof. Dr. Carlos Henrique Nery Costa - UFPI  
(Presidente)

Adipha

[Assinatura]

Prof. Dr. Vladimir Costa Silva - UFPI  
(Examinador)

Aprovado/  
Satisfatório

Vladimir Costa Silva

Profa. Dra. Dorcas Lamounier Costa - UFPI  
(Examinadora)

Satisfatório

Dorcas Costa

Profa. Dra. Clarissa Romero Teixeira – Fiocruz  
(Examinadora)

satisfatório

Clarissa Teixeira

Profa. Dra. Gisele Elias Nunes Pauli - UFSC  
(Examinadora)

Satisfatório

Gisele Elias Nunes Pauli

**DATA DA AVALIAÇÃO:** 27 de março de 2018.

**HORÁRIO:** 08:30h

**LOCAL:** No auditório Laboratório de Pesquisa em Leishmanioses do Instituto de Doenças Tropicais Natan Portella.



*Mateus e Paulo Roberto, filhos queridos, pelo amor puro, incondicional e sorriso sincero cheio de alegria que encantam minha vida imensuravelmente. Que todos os meus feitos sirvam de exemplo e inspiração.*

## AGRADECIMENTOS

A **Deus**, por sua infinita graça e misericórdia, por guiar e iluminar meus caminhos; por ser o meu refúgio e a minha fortaleza, auxílio sempre presente na adversidade.

Ao meu orientador, Prof. Dr. **Carlos Henrique Nery Costa**, pela sua admirável e indelével capacidade de fazer ciência, pela generosidade de compartilhar seus conhecimentos com tantas gerações, pela disponibilidade constante e por confiar, acreditar e exigir sempre mais de mim.

À Prof<sup>ª</sup>. Dra. **Dorcas Lamourier Costa**, pelo exemplo de generosidade, dedicação e comprometimento com a profissão e pesquisa. Seus ensinamentos clínicos foram fundamentais para o desenvolvimento desta pesquisa.

Ao Prof. Dr. **Vladimir Costa**, pela amizade, incentivo no desenvolvimento da tecnologia gerada neste trabalho e disponibilidade em compartilhar seus conhecimentos biotecnológicos.

A Prof<sup>ª</sup>. Dra. **Carla Eiras** pela receptividade no laboratório interdisciplinar de materiais avançados (LIMAV), por compartilhar conhecimentos e me inserir em novos caminhos, onde jamais imaginei trilhar.

Aos colaboradores da UFSC, Prof. Dr. **Ivan Helmuth Bechtold**, por me receber e acreditar no desenvolvimento deste projeto. A Pós-Dra. **Gisele Elias Nunes Pauli**, pela receptividade, parceria e entusiasmo em desenvolver este sensor de fluxo lateral. Seus conhecimentos e sua disponibilidade foram fundamentais. Grata pela amizade e carinho que você e seu esposo, Fábio sempre me receberam.

Ao Prof. Dr. **Lívio César Figueiredo**, pelas inúmeras correções na redação da patente e artigo de prospecção científico-tecnológica.

Ao Prof. Dr. **Ricardo de Andrade Lira Rabelo**, pela parceria no desenvolvimento do dispositivo para *smartphones*.

A querida amiga, Prof<sup>ª</sup>. Dra. **Débora Cavalcante Braz**, pela generosidade em me acompanhar integralmente nos experimentos de citometria de fluxo.

Aos colegas MSc **Handerson Rodrigues Silva Lima**, Dr. **Paulo Ronaldo Sousa Teixeira** e MSc. **Ana Siqueira do Nascimento Marreiro** pela paciência e orientações no desafio de realizar as prospecções científico-tecnológicas e redação da patente.

Ao amigo talentoso, MSc. **Emanuel Airton de Oliveira Faria**, pelos ensinamentos básicos de eletroquímica; pela orientação, gentileza, disponibilidade e companheirismo na

redação dos artigos. Meus conhecimentos não eram proporcionais aos meus sonhos científicos. Juntos sonhamos e trabalhamos duro. Que venham os frutos.

A MSc. **Amanda Andrade**, pelas inúmeras conferências dos gráficos, tabelas, paginação e referencial teórico deste trabalho. Procurarmos atingir a perfeição.

Aos colegas do laboratório de pesquisa em **Leishmaniose do Instituto de Doenças Tropicais Natan Portela** e do **Laboratório Interdisciplinar de Ciências de materiais** pela oportunidade de poder fazer parte e somar o conhecimento de vocês aos meus conhecimentos.

Á **Universidade Federal do Piauí**, pela oportunidade.

Ao programa de doutorado **RENORBIO**, pela oportunidade de fazer ciência e aprimorar meus conhecimentos. Aos colegas de turma do curso, meu obrigado pela amizade e pela contagiante vontade de crescimento profissional.

Aos **pacientes, aos seus pais e aos seus responsáveis**, pela infinita bondade que os motivou a participar deste estudo sabendo que nenhum benefício teriam; por acreditarem nas boas intenções.

Aos meus pais **Paulo Roberto** e **Suzulei**, pelo exemplo de vida, honestidade, trabalho e dedicação sem medida para a minha formação moral e profissional.

Ao meu irmão **Paulo Henrique**, pelo amor e amizade de uma vida toda.

Ao **Gerônimo Jr**, companheiro querido, admirador e incentivador incansável, por representar o mais perfeito significado da palavra amor na minha vida.

## RESUMO

Os ensaios de fluxo lateral, do inglês “Lateral Flow Assay” (LFA) ou teste de tira, são utilizados há algumas décadas como testes rápidos. Desde o surgimento das primeiras tiras, na década de 70, a qualidade e intensidade do sinal colorimétrico melhoraram com o advento da nanotecnologia. O diagnóstico e controle de doenças, principalmente as negligenciadas, frequente nos países em desenvolvimento, vem sendo o alvo principal de tecnologias, como a imunocromatografia. A Leishmaniose visceral (LV) é uma doença grave, letal que afeta 12 milhões de pessoas em 98 países. Clinicamente a enfermidade é caracterizada como um protótipo de disfunção imune específica e em resposta uma gama de interleucinas são acionadas, elevando os seus níveis séricos. A interleucina-6 (IL-6) é uma citocina multifuncional que desempenha papel-chave não apenas no sistema imunológico, mas também em uma variedade de processos biológicos. Na LV esta citocina está relacionada a fatores de gravidade e óbito. Este estudo teve como objetivo desenvolver um dispositivo simples para detecção rápida da IL-6 e identificação de pacientes com LV grave. Duzentos e trinta e cinco pacientes com suspeita clínica de LV tiveram sangue e medula óssea coletados para confirmação diagnóstica da doença. Cento e um pacientes tiveram diagnóstico confirmado para LV por pesquisa direta ou cultura. Amostras de plasma foram quantificadas para IL-6 por citometria de fluxo e tecnologia LFA. A concentração média do IL-6 no grupo de estudo foi 232,8 pg/mL e esteve associada a fatores de gravidade da LV tais como sepse, sangramento e óbito. Pacientes com maior probabilidade de morte apresentaram níveis mais elevados de IL-6 e proteína C-reativa ( $p < 0,0001$  e  $p = 0,0367$ , respectivamente). O aumento de IL-6 também esteve positivamente correlacionado ao aumento da proteína C-reativa ( $r = 0,6997$ ;  $p < 0,0001$ ). O melhor modelo de montagem do teste LFA deu-se em função das características do plasma humano e o cromógeno de marcação foi a nanopartícula de ouro (AuNPs) com diâmetro médio de 14 nm. O teste de agregação do anticorpo AuNPs/Anti-IL-6 mostrou-se satisfatório para as concentrações de 200,0 a 800,0  $\mu\text{g/mL}$ . Para validação do teste LFA montou-se uma curva padrão com a proteína IL-6 recombinante (0 – 10.000 ng/mL) a qual mostrou-se linear com coeficiente angular de inclinação de  $0,005 \times 4,42$  e coeficiente de correlação, 0,987 e LD 0,72 ng/mL. A curva padrão com 800,0  $\mu\text{g/mL}$  de Anti-IL-6 no conjugado mostrou ser reprodutível (SD = 0,16; SE = 0,08). O coeficiente de repetitividade para as duplicatas foi de 76,8%. Amostras reais mensuradas em três condições diferentes, evidenciaram que quanto maior a concentração de anti-IL-6 no conjugado, maior o número de amostras positivas e correspondentes visualmente com a curva padrão para a proteína pura. O fluxo de amostra foi satisfatório para 88,9% das amostras. Níveis de IL-6 mensurados por citometria de fluxo mostraram-se correlacionados com a tecnologia LFA ( $r = 0,2218$ ;  $p = 0,0159$ ). Foram realizados testes de seletividade com as citocinas IL-8, IL-10 e IL-12 e não houve marcação em nenhum dos testes. O dispositivo simples, LFA, denominado *Quick-IL test* (IL-6), mostrou-se sensível, específico e seletivo. O método semiquantitativo mostrou-se eficaz para caracterização de pacientes com LV grave. O aplicativo de leitura para dispositivos móveis captura, processa e quantifica as imagens comparando com a escala de cor padrão, considerando interferentes ambientais.

**Palavras-chave:** Teste rápido; Interleucina 6 (IL-6); Leishmaniose visceral.

## ABSTRACT

Lateral flow assay (LFA) or *strip test*, have been used for decades as quick tests. Since the first strips, in the 1970's years, quality and intensity of the colorimetric signal have improved with the advent of nanotechnology. Diagnosis and control of diseases, especially neglected diseases, common in developing countries, has been the main target of technologies, such as immunochromatography. Visceral Leishmaniasis (VL) is a serious, lethal disease that affects 12 million people in 98 countries. Clinically the disease is characterized as a prototype of specific immune dysfunction and in response, cytokines are increased. Interleukin-6 (IL-6) is a multifunctional cytokine that plays a key role not only in the immune system but also in a variety of biological processes. In VL, it's correlated with severe factors and death. This study aimed to develop a simple device for quick detection of IL-6 and identification of severe VL. Two hundred and thirty-five patients with clinical suspicion of VL had blood and bone marrow collected. One hundred and one patients had VL confirmed by direct research or culture. Plasma samples were quantified for IL-6 by CBA and LFA technology. The mean IL-6 concentration in the study group was 232.8 pg / mL and are associated with severe VL and factors such as sepsis, bleeding, and death. Patients with higher probability of death had higher levels of IL-6 and C-reactive protein ( $p < 0.0001$ ;  $p = 0.0367$ , respectively). IL-6 was positive correlated with C-reactive protein ( $r = 0.6997$ ;  $p < 0.0001$ ). The best model of the LFA test was based on gold nanoparticle (AuNPs) for chromogen detection. The mean diameter of AuNPs were 14 nm. Antibody aggregation test, AuNPs/Anti-IL-6 were satisfactory at concentrations 200.0 to 800.0 µg/ml. Validation LFA test were made by standard curve with the recombinant IL-6 protein (0 - 10,000 ng/mL) which linear slope coefficient (0.005 x 4.42) and correlation coefficient, 0.987. The standard curve with 800.0 ng/mL of Anti-IL-6 on conjugate was reproducible (SD = 0.16; SE = 0.08). The repeatability coefficient for the duplicates was 76.8%. Samples measured in three different conditions, showed higher concentration of anti-IL-6 in the conjugate, results the greater number of positive samples and visual correspondence with the standard curve. Samples had constant flow for 88.9% of the tests. IL-6 levels measured by CBA were correlated with LFA technology ( $r = 0.2218$ ;  $p = 0.0159$ ). Selective tests were performed by cytokines IL-8, IL-10 and IL-12 and there was no labeling in any of the tests. LFA device, *Quick-IL test* (IL-6), was sensitive, specific and selective. The quantitative method proved to be effective to characterize severe VL patients. The smartphone devices for IL-6 interpretation of results, captures, processes and quantifies the image by comparing it with the standard color scale, considering environmental interferers.

**Key words:** *Quick test*, Interleukin 6 (IL-6), Visceral leishmaniasis.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1.</b>	Desenho esquemático dos componentes de um sensor de fluxo lateral. 1. membrana receptora de amostra; 2. membrana suporte do conjugado; 3. membrana de nitrocelulose; 4. membrana absorvente; 5. cartão suporte.....	25
<b>Figura 2.</b>	Desenho esquemático dos componentes de um sensor de fluxo lateral, evidenciando a zona de detecção com marcações em ponto e linha, caracterizadas como T para a marcação de teste e C para a marcação do controle positivo do teste.....	26
<b>Figura 3.</b>	Esquema representativo da interação parasita-hospedeiro na infecção por <i>L. infantum</i> , ressaltando a ativação e imunossupressão de citocinas.....	41
<b>Figura 4.</b>	Esquema ilustrativo do preparo das nanopartículas de ouro em solução coloidal. ....	58
<b>Figura 5.</b>	Representação esquemática ilustrativa da conjugação de nanopartículas de ouro em solução coloidal com anticorpo anti-IL-6 e preparo da fibra de vidro (imersão à secagem) para montagem do teste rápido. ....	59
<b>Figura 6.</b>	Representação esquemática ilustrando o pré-tratamento da membrana de celulose ou membrana filtro da amostra para montagem do teste rápido. ....	59
<b>Figura 7.</b>	Representação esquemática demonstrando a montagem do teste rápido para interleucina 6 por sobreposição das membranas que compoem o teste.....	60
<b>Figura 8.</b>	Representação esquemática de um teste LFA em nitrocelulose HF180, com anticorpos imobilizados a 25 e 35 mm respectivamente, pronta para utilização. ....	61
<b>Figura 9.</b>	Representação esquemática do fluxo de plasma humano no teste rápido para IL-6. ....	62
<b>Figura 10.</b>	Representação esquemática do teste rápido no formato sanduíche a partir da ligação da proteína IL-6 com o conjugado (Anti-IL-6/AuNPs), que através do fluxo, chega ao ponto de teste (T)	

	formando o sanduíche com o anticorpo Anti-IL-6 primário. A segunda marcação, representada pela zona de controle (C) evidencia a ligação do reagente da área de controle (Anti-mouse IgG), anticorpo secundário, que se liga ao <i>Mouse</i> Anti-IL-6/AuNPs, caracterizando a funcionalidade do teste com a marcação pontual de controle positivo.....	63
<b>Figura 11.</b>	Representação esquemática do teste rápido no formato sanduíche negativo e positivo em diferentes concentrações para a IL-6. ....	64
<b>Figura 12.</b>	Correlação positiva entre a concentração de interleucina 6 medida no plasma com o percentual de probabilidade de morte dos pacientes com leishmaniose visceral.....	76
<b>Figura 13.</b>	Correlação positiva entre a concentração de proteína C-reativa no plasma com o percentual de probabilidade de morte dos pacientes com leishmaniose visceral.....	77
<b>Figura 14.</b>	Associação entre o percentual de probabilidade de morte dos pacientes com leishmaniose visceral na presença e ausência de coinfeção HIV-1/Leishmania.....	77
<b>Figura 15.</b>	Correlação entre a concentração de interleucina 6 com a proteína C-reativa no plasma de pacientes com leishmaniose visceral.....	80
<b>Figura 16.</b>	Espetro de UV-Visível de AuNPs com $\simeq$ 14 nm de diâmetro a uma concentração de 5,70 nM. A banda LSPR encontra-se situada a 520 nm .....	83
<b>Figura 17.</b>	Micrografia TEM com escala de 50,0 nm, caracterizando a homogeneidade de forma e tamanho das nanopartículas de ouro. ....	84
<b>Figura 18.</b>	Histograma da distribuição de diâmetro médio das partículas de ouro, evidenciando o predomínio de partículas de aproximadamente 14,0 nm, utilizando programa ImageJ .....	84
<b>Figura 19.</b>	Teste de agregação de AuNPs nas concentrações de 800,0 $\mu$ g/mL; 600,0 $\mu$ g/mL; 400,0 $\mu$ g/mL; 200,0 $\mu$ g/mL; 20,0 $\mu$ g/mL; 5,0 $\mu$ g/mL; 1,0 $\mu$ g/mL e 0 $\mu$ g/mL de anti-IL-6, na presença e na ausência de cloreto de sódio.....	85

<b>Figura 20.</b>	Curva padrão de IL-6 de acordo com a intensidade de cor, utilizando tiras do teste rápido LFA, para as concentrações de 0 ng/mL; 10 ng/mL, 100 ng/mL, 500 ng/mL, 1.000 ng/mL, 2.500 ng/mL; 5.000 ng/mL e 10.000 ng/mL de interleucina 6 recombinante.....	86
<b>Figura 21.</b>	Imagem da tiras de curva padrão transformada para a escala de cinza, nas concentrações de 10 ng/mL, 50 pg/mL, 100 ng/mL, 1.000 ng/mL, 5.000 ng/mL e 10.000 ng/mL de interleucina 6 recombinante, para leitura dos pixels nas áreas de teste e controle para quantificação pelo programa ImageJ. ....	86
<b>Figura 22.</b>	Distribuição da quantidade de pixels na área medida (nm <sup>2</sup> ) pela intensidade de cor, de acordo com os ng/mL de IL-6. ....	88
<b>Figura 23.</b>	Representação gráfica linear da porcentagem de cor de acordo com a concentração de IL-6. ....	88
<b>Figura 24.</b>	Regressão linear simples entre a concentração de interleucina 6 medida por citometria de fluxo e o percentual de intensidade de cor quantificado no ImageJ para as amostras mensuradas no sensor de fluxo lateral.....	92
<b>Figura 25.</b>	Esquema representativo do aplicativo de leitura colorimétrica para o <i>Quick IL test</i> (IL-6). (A) Ilustração da tela de captura de imagem do dispositivo, ressaltando a área de teste; (B) Ilustração do processamento de leitura quantitativa de acordo com a curva padrão colorimétrica.....	94
<b>Figura 26.</b>	Ilustração dos elementos que compõem o Kit <i>Quick-IL test</i> (IL-6). 1. frasco de solução de corrida 5,0 mL; 2. dispositivo teste, pronto para uso; 3. Pipeta sorológica graduada. ....	105

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b>	Interpretação da escala de referência do índice de Kappa .....	71
<b>Tabela 2.</b>	Características dos pacientes com leishmaniose visceral que compõem o estudo .....	75
<b>Tabela 3.</b>	Associações entre as variáveis clínicas e os níveis de IL-6 no plasma de pacientes com LV .....	79
<b>Tabela 4.</b>	Associações entre as variáveis clínicas e os níveis de CRP no plasma de pacientes com LV .....	81
<b>Tabela 5.</b>	Distribuição da área em nm <sup>2</sup> correspondente aos pixel contados de acordo com a coloração das imagens .....	87
<b>Tabela 6</b>	Caracterização das amostras de plasma testadas para as concentrações de anti-IL-6 estudadas no sensor LFA, baseadas na avaliação óptica.....	91

## LISTA DE ABREVIATURAS

Abs	Anticorpo
Ags	Antígeno
AS	<i>Assay diluent</i>
AL	<i>Tissue Lysis Buffer</i>
AuNPs	Nanopartículas de ouro
BD	Becton Dickinson
BSA	Soro albumina bovina
°C	Graus centígrados – ( <i>Celsius</i> )
CRP	Proteína C-reativa
CBA	<i>Citometry bead array</i>
CBA <i>Flex</i>	<i>Cytometric bead array flex</i>
CD4	Células T, tipo CD4
CD8	Células T, tipo CD8
CD30	Antígeno receptor de membrana ligante de citocina
CD40	Proteína expressa nas células apresentadoras de antígenos
CD40L (CD154)	Proteína expressa nas células T ativadas (ligante)
CD126	Receptor de interleucina 6
CD130	Glicoproteína de 130 KDa
cm	Centímetro
CR1	Receptor do complemento 1
CR3	Receptor do complemento 3
CNS	Conselho Nacional de Saúde
CXCL8	Interleucina modificada ligante 8 (IL-8)
C3bi	Opsonina C3b inativada
EDTA	Ácido etileno-diamino tetra-acético
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
FACTUS	<i>Factory of Computational Solutions</i>
g	Grama
gp 63	Glicoproteína de 63 kDa
gp 130	Glicoproteína de 130 KDa
HAuCl <sub>4</sub>	Cloreto de ouro III

HCMV	<i>Human citomegalovirus</i>
HF	<i>Hi Flow</i>
HIV-1	Vírus da imunodeficiência humana
HPR	Peroxidase de rábano
IFN- $\gamma$	Interferon do tipo gama
IDTNP	Instituto de Doenças Tropicais Natan Portela
IL	Interleucina (citocina)
IL-1 $\beta$	Interleucina 1 tipo beta
IL-4	Interleucina 4
IL-5	Interleucina 5
IL-6	Interleucina 6
IL-6R	Receptor de interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
IL-17	Interleucina 17
Ig	Imunoglobulina
Ig1	Imunoglobulina tipo 1
IgA	Imunoglobulina tipo A
IgD	Imunoglobulina tipo D
IgE	Imunoglobulina tipo E
IgG	Imunoglobulina tipo G
IgM	Imunoglobulina tipo M
iNOS	Óxido nítrico sintaxe induzido
kDa	KiloDalton
kV	Quilovolt
L	<i>Leishmania</i>
LCME	Central de Microscopia Eletrônica
LD	Limite de detecção
LFA	<i>Lateral flow assay</i>
LFIA	<i>Lateral flow immunoassays</i>
Ln	Logaritmo natural
LSPR	Localized surface plasmonic resonance

LT	Leishmaniose tegumentar
LV	Leishmaniose visceral
LPG	Lipofosfoglicano
LPS	Lipopolisacarídeo
m	Metro
MCP	<i>Macrophage chemotactic protein</i>
mL	Mililitros
mm	Milímetro
mM	Milimolar
MHC II	Complexo principal de histocompatibilidade classe II
MIF	Fator inibitório de migração de macrófago
MIP-1 $\beta$	<i>Macrophage inflammatory protein type 1 beta</i>
n	Número
NADPH	<i>Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase</i>
ng	Nano gramas
NK	<i>Natural killer</i>
nm	Nanômetro
nm <sup>2</sup>	Nanômetro quadrado
NO	Óxido nítrico
OMS	Organização Mundial de Saúde
P	Valor estatístico de <i>p</i>
PAMPs	Padrões moleculares associados a patógenos
PBS	Tampão fosfato-salino
PE	Florescência
pg	Picogramas
PI	Piauí
PM	Probabilidade de morte
<i>R</i>	Coefficiente de correlação
ROC	<i>Continuous Receiver Operating curve</i>
rpm	Rotações por minuto
SD	<i>Standard deviation</i>
SE	<i>Standard error</i>
SELEX	<i>Systematic evolution of ligands by exponential enrichment</i>

sIL-6R	<i>Soluble Interleukin-6 receptor</i>
SOCS	<i>Suppressors of cytokine signalling</i>
STAT3	<i>Signal transducers and activators of transcription</i>
TEM	Microscópio eletrônico de transmissão
Th	Linfócitos T <i>helper</i>
Th1	Linfócitos T <i>helper</i> subtipo 1
Th2	Linfócitos T <i>helper</i> subtipo 2
Th17	Linfócitos T <i>helper</i> subtipo 17
TGF- $\beta$	Fator de transformação de crescimento beta
TLRs	Receptores tipo <i>Toll</i>
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral alfa
TS	<i>Top standard</i>
Treg	Células T reguladoras
TLR2	<i>Toll-Like receptor 2</i>
TLR4	<i>Toll-Like receptor 4</i>
TRL7	<i>Toll-Like receptor 7</i>
TRL9	<i>Toll-Like receptor 9</i>
$\mu$ L	Microlitro
UFSC	Universidade Federal de Santa Catarina
UFPI	Universidade Federal do Piauí
UV	Ultravioleta
Vs	<i>Versus</i>
$X^2$	Qui-quadrado
WHO	World Health Organization
WB	<i>Wash buffer</i>
®	Marca registrada

# SUMÁRIO

<b>APRESENTAÇÃO .....</b>	<b>20</b>
<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>21</b>
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA.....</b>	<b>22</b>
2.1 TESTES RÁPIDOS .....	22
2.1.1 <i>LATERAL FLOW ASSAY (LFA)</i> .....	23
2.1.2 COMPONENTES DO SENSOR DE FLUXO LATERAL .....	26
2.1.2.1 MEMBRANA RECEPTORA DE AMOSTRA .....	26
2.1.2.2 MEMBRANA SUPORTE DO CONJUGADO .....	27
2.1.2.3 MEMBRANA DE NITROCELULOSE – ZONA DE DETECÇÃO .....	28
2.1.2.4 MEMBRANA ABSORVENTE .....	29
2.1.3 FORMATOS DE LFA .....	29
2.1.4 ANTICORPO.....	30
2.1.5 PARTÍCULA DETECTORA DO SINAL NO LFA .....	31
2.1.6 DESENVOLVENDO UM SENSOR DE FLUXO LATERAL .....	34
2.2 PARÂMETROS DE AVALIAÇÃO E VALIDAÇÃO DE TESTES RÁPIDOS .....	34
2.3 LEISHMANIOSES.....	35
2.3.1 AGENTE ETIOLÓGICO E INFECÇÃO.....	36
2.3.2 FISIOPATOLOGIA.....	37
2.3.3 CITOCINAS.....	42
2.3.3.1 CITOCINAS NA LV .....	42
2.3.4 INTERLEUCINA 6.....	44
2.3.4.1 IL-6 NA LV.....	46
2.3.5 PROTEÍNA C-REATIVA .....	48
2.3.5.1 PROTEÍNA C-REATIVA NA LV .....	50
2.3.6 PATOGENIA.....	51
2.3.7 CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA DA LV.....	51
2.4 SOFTWARE DE LEITURA PARA DISPOSITIVOS MÓVEIS .....	54
<b>3 OBJETIVOS .....</b>	<b>56</b>
3.1 OBJETIVOS GERAIS .....	56
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	56
<b>4 METODOLOGIA .....</b>	<b>57</b>
4.1 DESENVOLVIMENTO DO PROTÓTIPO – QUICK-IL TEST (IL-6).....	57
4.1.1 SOLUÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE OURO COLOIDAL.....	57
4.1.2 TESTE DE AGREGAÇÃO AUNPS/ANTI-IL-6 .....	57
4.1.3 SOLUÇÃO DO CONJUGADO - AUNPS/ANTI-IL-6 .....	58

4.1.4 MEMBRANA SUPORTE DO CONJUGADO - “ <i>CONJUGATION PAD</i> ” .....	58
4.1.5 MEMBRANA RECEPTORA DE AMOSTRA - “ <i>SAMPLE PAD</i> ” .....	59
4.1.6 CONSTRUÇÃO DO TESTE RÁPIDO – <i>QUICK-IL TEST (IL-6)</i> .....	60
4.1.7 IMOBILIZAÇÃO DO ANTICORPO NA MEMBRANA DE NITROCELULOSE.....	60
4.1.8 CURVA PADRÃO COLORIMÉTRICA .....	61
4.1.9 PROTOCOLO DE EXECUÇÃO DO TESTE RÁPIDO <i>QUICK-IL TEST (IL-6)</i> .....	62
4.1.10 PROTOCOLO DE INTERPRETAÇÃO DO TESTE RÁPIDO <i>QUICK-IL TEST (IL-6)</i> .....	62
4.1.11 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE OURO .....	64
4.2 DESENHO DO ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO .....	65
4.2.1 <i>DESIGN</i> .....	65
4.2.2 POPULAÇÃO ALVO .....	65
4.2.3 POPULAÇÃO FONTE.....	65
4.2.4 POPULAÇÃO DE ESTUDO .....	65
4.2.5 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO .....	65
4.2.6 DEFINIÇÕES .....	65
4.2.7 CONSIDERAÇÕES SOBRE A AMOSTRA .....	66
4.2.8 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS.....	67
4.2.9 MENSURAÇÃO DA EXPOSIÇÃO .....	67
4.2.9.1 OBTENÇÃO DA AMOSTRA.....	67
4.2.9.2 SANGUE PERIFÉRICO E PLASMA.....	67
4.2.10 MENSURAÇÃO DO EFEITO .....	68
4.2.10.1 CITOMETRIA DE FLUXO (CBA) PARA IL-6 .....	68
4.2.10.1.1 PADRÃO CBA-FLEX .....	68
4.2.10.1.2 SOLUÇÃO COM “BEADS” DE CAPTURA CBA-FLEX .....	68
4.2.10.1.3 ADIÇÃO DA FLORESCÊNCIA - PE CBA-FLEX .....	69
4.2.10.1.4 ENSAIO CBA-FLEX.....	69
4.2.10.1.5 AQUISIÇÃO DAS AMOSTRAS NO CITÔMETRO DE FLUXO .....	69
4.2.10.2 QUANTIFICAÇÃO DA PROTEÍNA C-REATIVA.....	69
4.2.10.3 ANÁLISE DE DADOS GERADOS.....	70
4.2.10.3.1 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	70
4.2.10.3.2 ANÁLISE DA PROBABILIDADE DE MORTE.....	71
4.2.10.3.3 ANÁLISE DA INTENSIDADE DE COR DA CURVA PADRÃO IL-6 .....	71
4.2.10.3.4 ANÁLISE DAS PROPRIEDADE DAS AUNPS UTILIZADAS NO TESTE RÁPIDO .....	72
4.3 CONTROLE DE QUALIDADE E VALIDAÇÃO DO TESTE LFA (IL-6) .....	72
4.4 <i>SOFTWARES</i> PARA DISPOSITIVOS MÓVEIS .....	74
<b>5 RESULTADOS.....</b>	<b>75</b>
SEÇÃO I.....	75
5.1 INTERLEUCINA 6 NA DOENÇA GRAVE.....	75
5.1.1 CARACTERIZAÇÃO DO GRUPO DE ESTUDO PARA LV .....	75
5.1.2 PROBABILIDADE DE MORTE .....	76

5.1.3 INTERLEUCINA 6 .....	78
5.1.4 PROTEÍNA C-REATIVA .....	80
5.1.5 CARACTERIZAÇÃO DO GRUPO CONTROLE SAUDÁVEIS .....	81
5.1.6 CARACTERIZAÇÃO DO GRUPO COM SEPSE .....	82
SEÇÃO II .....	83
5.2 CARACTERIZAÇÃO DO TESTE LFA – <i>QUICK-IL TEST</i> (IL-6) .....	83
5.2.1 CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE OURO .....	83
5.2.2. TESTE DE AGREGAÇÃO DAS AUNPS NO CONJUGADO .....	85
5.2.3. INTERPRETAÇÃO DA CURVA PADRÃO PARA IL-6 RECOMBINANTE .....	85
SEÇÃO III .....	90
5.3. CARACTERIZAÇÃO DOS GRUPOS DE ESTUDO PARA VALIDAÇÃO DO SENSOR LFA – <i>QUICK-IL TEST</i> (IL-6) .....	90
5.4. VALIDAÇÃO DO ENSAIO LFA PARA IL-6 – <i>QUICK-IL TEST</i> (IL-6) .....	91
5.4.1 VALIDAÇÃO DO ENSAIO LFA PELA CURVA PADRÃO COLORIMÉTRICA .....	91
5.4.2 VALIDAÇÃO DO ENSAIO LFA COM O GRUPO LV .....	92
SEÇÃO IV .....	94
5.4 APLICATIVO DE LEITURA PARA DISPOSITIVOS MÓVEIS .....	94
<b>6 DISCUSSÃO .....</b>	<b>95</b>
6.1. DESENVOLVIMENTO DO PROTÓTIPO .....	95
6.2 INTERLEUCINA 6 NA LV GRAVE .....	100
<b>7 CONCLUSÕES .....</b>	<b>104</b>
<b>8 PERSPECTIVAS FUTURAS .....</b>	<b>105</b>
<b>REFERÊNCIAS BLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>106</b>
<b>APÊNDICE .....</b>	<b>132</b>
APÊNDICE 1: PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA E PESQUISA .....	133
APÊNDICE 2: DECLARAÇÃO DE SUBMISSÃO DA PATENTE .....	134
APÊNDICE 3: PATENTE .....	135
APÊNDICE 4: COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DO ARTIGO DE PROSPECÇÃO .....	136
APÊNDICE 5: PROSPECÇÃO CIENTÍFICA E TECNOLÓGICA .....	137
APÊNDICE 6. TERMOS DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO .....	152
APÊNDICE 7: QUESTIONÁRIO ESTRUTURADO PARA ENFORMAÇÕES CLÍNICAS .....	161

## APRESENTAÇÃO

A leishmaniose visceral (LV) é uma doença urbana, quase sempre sub-aguda, podendo ser raramente crônica, que acomete principalmente países em desenvolvimento com condições precárias de saneamento. No cenário nacional, o estado do Piauí, juntamente com Ceará, Maranhão e Pará são os estados com maior número de casos. O Instituto de Doenças Tropicais Natan Portella (IDTNP), localizado na cidade de Teresina, Piauí, recebe em média 300 a 400 casos de LV por ano, fato que levou pesquisadores deste instituto a criarem o maior banco de dados e material biológico ao longo dos últimos 15 anos, fazendo deste centro uma referência nas pesquisas de LV grave.

Os estudos anteriores que caracterizam o perfil clínico e imunológico da doença grave, descobriram marcadores que identificaram previamente quem são os doentes com maior risco de óbito. Dentro destas perspectivas, o desenvolvimento de testes rápidos passou a ser um desafio.

Neste contexto, este trabalho apresenta na revisão bibliográfica, o desenvolvimento da tecnologia descrito na seção 2.1. Na seção 2.2 serão apresentados os parâmetros de avaliação e a validação do teste. Subsequentemente, na seção 2.3, abordaremos a leishmaniose visceral e o papel da interleucina 6 na doença grave e por fim, apresentaremos na seção 2.4 o uso de aplicativos em dispositivos móveis para interpretação de testes diagnósticos

A metodologia também foi dividida em seções, sendo a primeira, relacionada ao produto da tecnologia, a segunda, reporta o estudo epidemiológico da população para validação do teste, a terceira os parâmetros de validação da tecnologia e a quarta o *software* de leitura para o teste rápido.

Os resultados serão apresentados em quatro seções. Na primeira apresentaremos as associações da interleucina 6 com a leishmaniose visceral grave, na seção II apresentaremos os resultados da padronização do teste rápido e posteriormente, apresentaremos as seções III e IV que abordarão validação do teste e aplicativo de leitura da intensidade colorimétrica do teste para dispositivos móveis.

## 1 INTRODUÇÃO

Em seres humanos, a leishmaniose visceral é caracterizada como um protótipo de disfunção imune específica (SAHA et al., 2006). Os mecanismos envolvidos na infecção pela *Leishmania* e sua relação com a gravidade da doença têm sido abordados por meio de avaliações do perfil imunofenotípicos e de produção de citocinas, assim como em outras doenças inflamatórias (CLARK et al., 2004; MISCH; HAWN, 2008; WARNER; MOLDAWER, 2008).

As citocinas são proteínas produzidas pela imunidade imune inata e adaptativa que expressam respostas imunológicas mediadas pelas vias de sinalização intracelular em resposta a infecções e inflamações sendo, portanto, considerados marcadores de imunidade. Na LV as mudanças sistêmicas nos níveis de citocinas refletem no agravamento da doença e na disseminação do parasito e podem levar a um espectro de manifestações clínicas e imunológicas. (SACKS; NOBEN-TRAUTH, 2002; WILSON; JERONIMO; PEARSON, 2005; PETERS; SACKS, 2006; COSTA, 2009; COSTA et al., 2010; COSTA et al., 2013).

Fatores de gravidade da LV estão relacionados a níveis elevados de IL-6 e proteína C-reativa, e são considerados marcadores de infecções e inflamações (PEPYS; HIRSCHFIELD, 2003).

A interleucina-6 (IL-6) é uma citocina multifuncional que desempenha um papel-chave não apenas no sistema imunológico, mas também em uma variedade de processos biológicos. Níveis elevados de IL-6 no soro estão associados com o desenvolvimento de cânceres e doenças inflamatórias, além de ser considerado um marcador precoce de inflamação. As concentrações de IL-6 em adultos saudáveis são inferiores a 6 pg/mL e variações pequenas podem ser importantes para diagnóstico e projeção da gravidade de doenças inflamatórias. Sabe-se que atualmente os métodos tradicionais de detecção da IL-6 são: *Enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) e *citometry bead array* (CBA), entretanto, são técnicas trabalhosas e caras para serem utilizadas na rotina diagnóstica. Como alternativa buscamos encontrar tecnologias para o desenvolvimento de um teste rápido. Atualmente, os sensores de fluxo lateral (Lateral Flow Assay - LFA) são tecnologias que asseguram resultados não só qualitativos e sim quantitativos e estão sendo utilizados como alternativa na rotina diagnóstica por serem produzidos em grande escala a um baixo custo e não necessitar de profissional habilitado para interpretação.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Testes rápidos

Testes rápidos são inovações tecnológicas que vêm ganhando mercado devido à necessidade de diagnóstico precoce, controle e monitoramento de um amplo espectro de doenças, com leitura visual em até 30 minutos (PEELING et al., 2006a).

Alguns métodos de diagnóstico são complexos e difíceis para serem aplicados em áreas sem infraestrutura adequada e recursos humanos capacitados, fazendo-se necessário o transporte de amostras ou de pacientes, o que muitas vezes pode comprometer os resultados em questão. O diagnóstico rápido e precoce permite intervenções apropriadas, prevenção de sequelas, interrupção da cadeia de transmissão, vigilância epidemiológica da infecção, além de intervenção clínica imediata (MABEY et al., 2004; PEELING et al., 2006a; PEELING et al., 2006b).

A produção e desenvolvimento de testes diagnósticos rápidos tem sido prioridade de grandes empresas biotecnológicas, uma vez que o mercado consumidor e os programas públicos de saúde buscam agilidade, facilidade e baixo custo para produção destas tecnologias. Atualmente o que se busca são testes simples, que possam ser utilizados diretamente pelos profissionais das unidades básicas de saúde e não requeiram equipamentos ou condições especiais de armazenamento com longo prazo de validade (RIDLEY, 2006).

Diante do cenário econômico atual, o investimento na área de desenvolvimento e comercialização de produtos nacionais competitivos isentos de impostos são capazes de gerar divisas e é considerado uma prioridade na área de biotecnologia aplicada à saúde pública (YAGER et al., 2006; ELLERBEE et al., 2009; HOLFORD; DAVIS; HIGSON, 2012).

Um amplo número de testes de diagnóstico rápido são baseados em princípios imunocromatográficos. No mercado estão disponíveis testes para diversas finalidades, sendo os mais comuns, os testes de gravidez, controle da ovulação, detecção de agentes infecciosos, drogas ilícitas e medição de vários analitos importantes para a fisiologia humana. Além destes produtos voltados para a área médica, existem testes rápidos voltados para as áreas forense, ambiental e agropecuária (PAROLO; MERKOCI, 2013; PAROLO et al., 2013).

Os testes rápidos são usados para informar a presença ou a concentração de uma ampla variedade de analitos. Quando o analito é uma proteína, então o elemento de reconhecimento biológico utilizado é normalmente um anticorpo (Abs) uma vez que a interação do Abs com a proteína, antígeno (Ags,) é específica. A combinação com nanomateriais, permitiu que estes

biossensores adiquirissem estabilidade, requeressem baixo volume de material para leitura, fossem de grande reprodutibilidade e apresentassem um preparo simples (VON LODE, 2005; CASTAÑEDA; ALEGRET; MERKOÇI, 2007; WARSINKE, 2009; OMIDFAR; KHORSAND; DARZIANI AZIZI, 2013).

Os imunoenaios geralmente são de duas categorias: diagnóstico qualitativo (presença ou ausencia, sim ou não) obtidos, por exemplo, por detecção visual simples; ou diagnóstico quantitativo que mede a concentração do antígenos. Os métodos quantitativos com visualização óptica, utilizam escalas colorimétricas para intervalos fixos que podem ser interpretados visualmente. A maioria dos métodos quantitativos necessitam de equipamentos para leitura óptica, espectrofotômetros, espectrofluorímetros e contadores de cintilação, equipamentos caros, os quais são considerados desvantagens deste tipo de testes, uma vez que os mesmos voltam a ter limitação de interpretação (ILDIKO et al., 1996; RIDLEY, 2006; TANAKA et al., 2006; LIU et al., 2008; PAROLO; MERKOCI, 2013; PAROLO et al., 2013).

Atualmente os *softwares* de leitura para dispositivos móveis têm sido uma promissora ferramenta para a interpretação dos testes semi-quantitativos, com interpretação subjetiva, permitindo caracterizá-los como quantitativo (HU et al., 2014; SANG et al., 2016).

### **2.1.1 Lateral Flow Assay (LFA)**

Os testes imunocromatográficos, também chamados de ensaios de fluxo lateral, sensor de papel ou teste de tira, vêm sendo utilizados há algumas décadas. Estes biossensores, considerados testes rápidos, são uma extensão tecnológica dos testes de aglutinação, desenvolvidos na década de 50 por Singer e Plotz (1956).

O desenvolvimento deste tipo de ensaio tem ampla aplicação prática, uma vez que são simples de fácil utilização, o resultado é imediato ou demanda apenas alguns minutos, a estabilidade e durabilidade se mantêm por um longo período e em variadas condições climáticas, além de demandar baixo custo para seu desenvolvimento. Estas características fazem os testes de tira uma ferramenta ideal para utilização em domicílio ou campo e não exige nenhum profissional habilitado para sua interpretação (PEELING et al., 2006b; ELLERBEE et al., 2009; WARSINKE, 2009; HOLFORD; DAVIS; HIGSON, 2012).

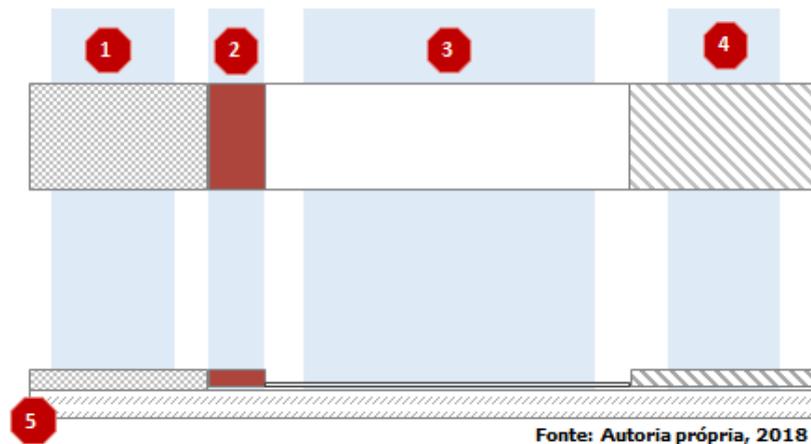
Os países em desenvolvimento, onde as tecnologias avançadas e caras são pouco acessíveis e não estão disponíveis para a grande maioria da população, são candidatos promissores e beneficiários em potencial para o desenvolvimento destes dispositivos de fluxo lateral (YAGER et al., 2006; PEELING; MABEY, 2010; MAHER et al., 2012).

Atualmente, os sensores de fluxo lateral são tecnologias que asseguram não só resultados qualitativos mas também quantitativos, de excelente qualidade. Desde o surgimento dos primeiros sensores, os testes de gravidez da década de 70, muitos materiais vêm sendo aprimorados para melhorar a qualidade destes dispositivos. Com o surgimento da nanotecnologia, o emprego das nanopartículas facilitou a interpretação dos resultados, melhorando a qualidade do sinal colorimétrico bem como a sensibilidade e especificidade dos testes tornando-os mais seletivos (POSTHUMA-TRUMPIE; KORF; VAN AMERONGEN, 2009; SONG et al., 2010; PAROLO; MERKOÇI, 2013; PAROLO; DE LA ESCOSURA-MUÑIZ; MERKOÇI, 2013; QUESADA-GONZÁLEZ; MERKOÇI, 2015).

Os ensaios que utilizam enzimas, imunoenaios de fluxo lateral são testes simples de reconhecimento rápido de proteínas desenvolvidos a partir de um imunoenensaio já existente, transportado para os sensores imunocromatográficos. A imunocromatografia representa uma tecnologia inovadora que concentra a reação Abs-Ags em uma única fase sólida podendo ser mantida em temperatura ambiente, com durabilidade e estabilidade prolongada (HOLLAND; EKIECHLE, 2005; WANG et al., 2006; KOETS et al., 2006; NIELSEN et al., 2008; HUANG et al., 2015).

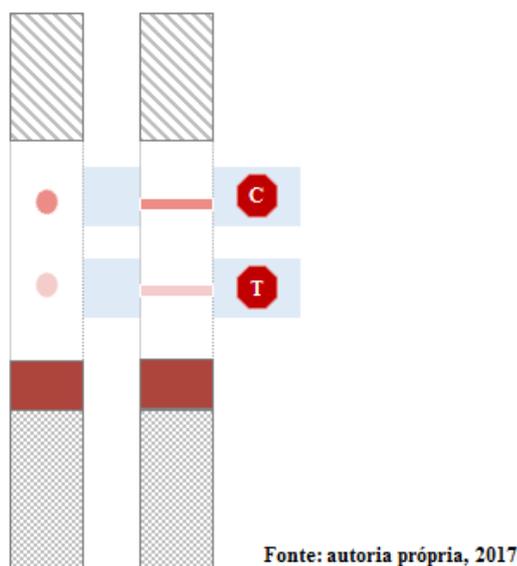
Existem 5 componentes principais que formam a tira de teste LFA: a membrana de nitrocelulose para detecção – “*Detection pad*” (1). Esta membrana é flanqueada em uma extremidade por uma membrana receptora de reagente ou amostra – “*Sample pad*” (2), constituída por fibra de algodão ou celulose e uma microfibras de vidro contendo o reagente cromógeno – “*Conjugation pad*” (3) e na outra extremidade por uma zona de absorção – “*Absorbant pad*” (4). Este conjunto é apoiado por um cartão suporte (5), cortado em tiras com tamanho adequado para a quantidade de analito a ser medido. Este esquema está representado na figura 1 (LITMAN; HANLON; ULLMAN, 1980; O’KEEFFE, et al., 2003; ZENG et al., 2011; ZENG et al., 2012a; ZENG et al., 2012b; GORYACHEVA; LENAIN; DE SAEGER, 2013; DZANTIEV et al., 2014; SAJID; KAWDE; DAUD, 2014; ZENG et al., 2014).

**Figura 1** - Desenho esquemático dos componentes de um sensor de fluxo lateral. 1. membrana receptora de amostra; 2. membrana suporte do conjugado; 3. membrana de nitrocelulose; 4. membrana absorvente; 5. cartão suporte.



O marcador óptico mais utilizado é o cromógeno, composto por nanopartículas de ouro coloidal, um marcador mais estável que reagentes fluorescentes ou enzimáticos (TANAKA et al., 2006). Um reagente de captura, (Abs-Ags) é inserido na forma de uma linha ou ponto na membrana de nitrocelulose, denominada linha/ponto teste “*test line*” (T). Um segundo reagente de captura é depositado numa segunda linha paralela à linha teste e funciona como controle – “*control line*” (C), figura 2. Os testes normalmente são lidos entre 15 e 30 minutos após aplicação de amostras que podem ser sangue total, soro, plasma, urina, saliva, ou outros (NAKAMURA; KARUBE, 2003; POSTHUMA-TRUMPIE; KORF; VAN AMERONGEN, 2009; SONG et al., 2010; PAROLO; MERKOCI, 2013).

**Figura 2.** Desenho esquemático dos componentes de um sensor de fluxo lateral, evidenciando a zona de detecção com marcações em ponto e linha, caracterizadas como T, para a marcação de teste e C para a marcação do controle positivo do teste.



### 2.1.2 Componentes do sensor de fluxo lateral

A escolha dos componentes para o desenvolvimento de um teste LFA deve levar em consideração os seguintes parâmetros: propriedades da amostra a ser medida, protocolo de execução, limite de detecção, sensibilidade, especificidade, tempo de execução do teste, interpretação e características dos resultados (ZENG et al., 2012a; ZENG et al., 2012b; MILLIPORE, 2013; ZENG et al., 2014; SAJID; KAWDE; DAUD, 2014).

A escolha da membrana receptora de amostra, suporte do conjugado e membrana absorvente leva em consideração várias características, sendo o tempo de fluxo da amostra, a principal delas (LEUVERING, et al., 1980; MILLIPORE, 2013; DZANTIEV et al., 2014; HUANG et al., 2015).

#### 2.1.2.1 Membrana receptora de amostra

A membrana receptora de amostra também conhecida como filtro de amostra – “*Sample pad*” tem várias funções, sendo a mais importante, promover a distribuição controlada e homogênea da amostra sobre o conjugado e a entrada da solução contendo amostra e conjugado na membrana de nitrocelulose, ou membrana de teste (MILLIPORE, 2013; PAROLO; MERKOCI, 2013; GE et al., 2014).

Há dois tipos de membrana para amostra, as fibras de celulose e as malhas de algodão. Os filtros de celulose apresentam características como a capacidade de receber volumes maiores de analito sem prejudicar a uniformidade da dispersão, menor custo, ampla capacidade de pré-tratamento, e a facilidade de cortar e manusear, propriedades que fazem deste tipo de filtro os mais utilizados no desenvolvimento de testes rápidos. Os filtros de malha, compostos por fibras mistas, não permitem tratamento com outros solventes para preservar as características das proteínas, por outro lado, são mais resistentes e capazes de reter as células vermelhas do sangue, liberando apenas o fluxo do plasma. Esta propriedade confere uma vantagem a aplicação de amostras de sangue total sem que haja interferência da pigmentação do sangue sobre a janela de leitura visual do teste (VERHEIJEN et al., 1998; CHOI et al., 2004; KOETS et al., 2006; MILLIPORE, 2013).

A escolha da membrana receptora de amostra leva em consideração os parâmetros que influenciam na taxa de liberação da amostra, principalmente a espessura e gramatura do filtro e pressão exercida dentro do teste. O contato prolongado da amostra com o conjugado sem sua exposição a Ags e Abs impregnados na membrana, permitem a competição entre as imunoglobulinas presentes na amostra impregnadas na linha controle, dificultando ou impedindo a coloração da linha afetando a validade do teste (LEUVERING et al., 1980; WANG et al., 2006; SAJID; KAWDE; DAUD, 2014).

A reação prolongada com o conjugado também limita a reação Ags-Abs na linha de teste, por promover a ligação inespecífica entre os reagentes. A passagem rápida da amostra pela zona de detecção, um problema comum até a adequação dos parâmetros internos do teste, não permite as reações Ags-Abs, que apresentam um tempo hábil para ocorrência, podendo não ocorrer ou mesmo ocorrer de maneira inadequada (LEUVERING et al., 1980; WANG et al., 2006; KALOGIANNI et al., 2007). Portanto, o uso de filtros inadequados afetam, em última análise a sensibilidade e especificidade do teste (ALSHTROM, 2010; MILLIPORE, 2013; SAJID; KAWDE; DAUD, 2014).

### **2.1.2.2 Membrana suporte do conjugado**

A membrana suporte do conjugado assim como as outras membranas apresentam características fundamentais para o bom desempenho do teste. A fibra de vidro é o material mais utilizado nos testes LFA, porém os filtros de celulose e filtros de poliéster com superfície modificada, também podem ser utilizados (MILLIPORE, 2013; SAJID; KAWDE; DAUD, 2014).

O suporte do conjugado ideal deve apresentar algumas características fundamentais a fim de permitir a qualidade, alta sensibilidade e especificidade do teste.

Componentes de membrana ideais permitem a boa impregnação de reagentes, evitando que o conjugado ou a amostra analisada fiquem aderidos as fibras da membrana, reduzindo a intensidade de coloração dos pontos de teste e controle. A uniformidade do fluxo é outro fator de grande importância pois ele deve garantir que o conjugado flua e se deposite de maneira homogênea ao longo da membrana permitindo o aparecimento uniformes da marcação. A retenção de substâncias inadequadas e volumes excessivos de líquidos logicamente influenciarão nas propriedades intra teste, desta forma a membrana deve reter um volume homogêneo de material garantindo que todos os testes de um mesmo lote apresentem a mesma concentração de conjugado (LEUVERING et al., 1980; POSTHUMA-TRUMPIE et al., 2009; MILLIPORE, 2013;).

### **2.1.2.3 Membrana de nitrocelulose – zona de detecção**

Alguns materiais já foram testados para serem utilizados na zona de detecção, sendo eles: Nylon (BUECHLER et al., 1992), polietersulfona (EDWARDS; BAEUMNER, 2006; KALOGIANNI et al., 2007), polietileno (FERNANDEZ-SANCHEZ et al., 2005), e a nitrocelulose, sendo esta última, a membrana mais frequentemente utilizada (LONNBERG; CARLSSON, 2001; OKU et al., 2001, ZHU et al., 2002; ZHANG et al., 2006; MILLIPORE, 2013; SAJID; KAWDE; DAUD, 2014).

A membrana de nitrocelulose é, possivelmente, o material mais importante no desenvolvimento de um teste de fluxo lateral. Essas membranas se ligam eletrostaticamente com proteínas através da interação do dipolo forte do nitrato éster com dipolo forte do peptídeo, e tornam-se neutras em sua capacidade de adsorver a proteína, independente do pH do meio. Características físico-químicas destas membranas influenciam sua capilaridade, que por sua vez afetam o grau de deposição dos reagentes, sensibilidade e especificidade do teste e a intensidade de coloração das linhas teste e controle (LONNBERG; CARLSSON, 2001; OKU et al., 2001, ZHU et al., 2002; ZHANG et al., 2006; MILLIPORE, 2013; SHARMA et al., 2015).

A escolha da membrana mais adequada passa pelo estudo de uma série de fatores, sendo a taxa de capilaridade o fator mais importante e para isto devem ser considerados: tamanho, linearidade e quantidade de poros (porosidade), área de superfície e características estruturais. Há uma correlação direta entre a capilaridade e a sensibilidade de um teste. Por exemplo, podem ser usadas membranas com alta capilaridade para testes em que haja excesso de amostra e a

sensibilidade não seja uma preocupação. Objetivando apenas a detecção, devem ser usadas membranas de baixa capilaridade onde a amostra é limitada e/ou se exige alta sensibilidade do teste, como os testes utilizados em hemocentros para a exclusão de eventuais diagnósticos (MILLIPORE, 2013; SHARMA et al., 2015).

#### **2.1.2.4 Membrana absorvente**

O filtro absorvente, composto por celulose, está posicionado na extremidade distal da membrana de nitrocelulose e tem como função principal permitir que maior volume de amostra adentre a zona do teste. Este maior volume é importante, pois pode ser utilizado para lavar partículas do reagente detector ligadas fracamente, reduzindo o número de ligações não específicas (MILLIPORE, 2013; SAJID; KAWDE; DAUD, 2014; SHARMA et al., 2015). O volume é aumentado tanto quanto este filtro absorvente é capaz de suportar.

#### **2.1.3 Formatos de LFA**

Existem dois formatos principais descritos para testes LFA, o competitivo e o formato sanduíche.

LFA no formato sanduíche, um Abs revestido por um marcador (enzimas, nanopartículas ou corante fluorescente) é imobilizado numa plataforma de conjugação para se ligar a proteína, formando o conhecido complexo “chave-fechadura” que se liga a um Abs primário na linha de teste, emitindo o sinal óptico. Este tipo de formato é utilizado para analitos grandes tais como, HIgG, PSA, HCG, CRP, ILs, etc.

O formato competitivo é adequado para compostos de baixo peso molecular como, como por exemplo, a maioria das toxinas, que não têm a capacidade de se ligarem a Abs simultaneamente. Quando a amostra migra até à linha de teste, o Ags pré-imobilizado, vai se ligar ao conjugado em dois possíveis casos, no caso de a amostra não conter o analito alvo ou no caso de conter em baixas concentrações, permitindo assim que nem todos os Abs do conjugado fiquem ligados ao Ags da amostra. O Ags presente na amostra e o que está imobilizado na linha de teste competem para se ligarem ao Abs conjugado. O formato de múltipla detecção é utilizado no diagnóstico de diferentes alvos. Os testes rápidos, neste caso apresentam um número de linhas/ponto de teste igual ao número de espécies alvo a serem analisadas (OH et al., 2014; SAJID; KAWDE; DAUD, 2014; XU et al., 2014).

### 2.1.4 Anticorpo

Anticorpos são glicoproteínas secretadas por linfócitos B especializados, com duas funções distintas: uma é se ligar especificamente ao antígeno alvo e outra é provocar uma resposta imune contra o Ags ligado ao recrutar outras células e moléculas. A associação entre um Abs-Ags envolve uma miríade de interações não covalentes entre o epítopo, sítio de ligação no Ags, e paratopes, sítio de ligação no Abs. A capacidade do Abs se ligar a qualquer superfície não própria com especificidade e alta afinidade não é apenas a chave da imunidade, mas também uma valiosa ferramenta para desenvolvimento em biologia experimental, pesquisa biomédica, diagnóstico e terapia. A diversidade de suas capacidades vinculativas é particularmente impressionante dada à alta semelhança estrutural entre todos os Abs (SELANG; KUNIK; OFRAN, 2013).

A especificidade da molécula de Abs para o seu Ags é explorada para análise do desenvolvimento de uma variedade de imunoenaios, vacinas e terapias. Recentemente algumas especialidades tem sido responsáveis por expandir a aplicação de Abs, permitindo melhorias de afinidade e especificidade (OHLIN et al., 1996; SODERLIND; OHLIN; CARLSSON, 1999; MIRICK et al., 2004). A compreensão do papel que cada elemento estrutural de Abs desempenha no reconhecimento do Ags é essencial para a engenharia bem sucedida.

Abs para serem utilizados em LFA devem ser sensíveis, específicos, com alto grau de pureza e estabilidade para não prejudicarem o desempenho final do teste. A pureza, consistência e clonagem dos Abs, também podem influenciar na qualidade do teste. Abs monoclonais apresentam alta especificidade diminuindo as ligações inespecíficas e cruzadas; Abs policlonais embora menos específicos, apresentam a capacidade de reconhecimento de múltiplos epítopos para um único Ag e apresentam um custo mais baixo (DUNBAR; SCHWOEBEL, 1990; O'KEEFFE, et al., 2003; SHARMA et al., 2015).

Para um desempenho eficaz intra-teste outros fatores devem ser considerados na escolha do Abs tais como: capacidade de ser absorvido em superfícies sólidas; capacidade de reativação após a reabsorção; manutenção da arquitetura estrutural após a secagem; capacidade de ligação não instantânea ao ser reativado, além da estabilidade entre suas ligações. Essas características são fundamentais para o desempenho dos LFA (MILLIPORE, 2013).

### 2.1.5 Partícula detectora do sinal no LFA

A escolha do marcador depende da sua aplicação no dispositivo LFA. Uma lista de materiais podem ser utilizados como: nanopartículas de ouro (AuNPs), prata, carbono, selênio ou até mesmo magnéticas, as *beads* de látex coloridas, pontos quânticos, conversão de fósforos, fluoróforos orgânicos, corantes têxteis, enzimas e lipossomos. Qualquer um destes materiais podem ser utilizados como marcadores, basta apenas, que sejam capazes de se ligar ao Abs e reconhecer o analito em questão e emitir o sinal óptico possibilitando a visualização do teste LFA. As características desejáveis são a não alteração dos recursos bioconjugáveis, a estabilidade por um longo período de tempo e a capacidade de ligação e detecção em baixas concentrações (LOU et al., 1993; GUSSENHOVEN et al., 1997; LONNBERG; CARLSSON, 2001; XU; MIRKIN, 2007; MEDLEY et al., 2008; WANG; KAPOOR, 2010; SAJID; KAWDE; DAUD, 2014; SHARMA et al., 2015).

Atualmente, com a intervenção da nanotecnologia, se tem dado preferência por materiais que apresentam características diferenciais e reduzem o custo técnico, encurtam etapas e amplificam sinais colorimétricos nos sensores (GUBALA et al., 2012). A nanotecnologia engloba ciência, engenharia e tecnologia conduzidas a nanoescala, operando no intervalo de 1 - 100 nm. Nanotecnologia não implica trabalhar apenas com materiais à nanoescala, implica também que esses materiais adquiram propriedades físicas, químicas, mecânicas e ópticas diferentes, exatamente por se encontrarem à nanoescala. Quando uma partícula se encontra à nanoescala, propriedades como a fluorescência, a condutividade elétrica, a reatividade química e o ponto de fusão são alteradas. O ouro à nanoescala ilustra na perfeição as propriedades únicas que advêm desta escala. As nanopartículas de ouro não apresentam cor amarela, como estamos habituados a observar à macroescala, mas sim uma cor vermelha ou roxa. À nanoescala os movimentos dos elétrons de valência do ouro são confinados, daí as AuNPs reagirem de diferente maneira com a luz (GOODSELL, 2004; DREXLER, 2007; FARIA-TISCHER; TISCHER, 2012; HOLZINGER; LE GOFF; COSNIER; 2014).

As nanopartículas metálicas têm sido extensivamente estudadas devido às suas propriedades ópticas únicas resultantes da banda de ressonância plasmônica de superfície localizada (LSPR). Quando a radiação eletromagnética interage com as nanopartículas conduz a uma oscilação coletiva dos elétrons na superfície das mesmas, originando uma ressonância plasmonica de superfície (WILLETS; VAN DUYNÉ, 2007; HAMMOND et al., 2014). Apresentam excepcionais coeficientes de absorção que vão permitir uma maior sensibilidade em métodos de detecção óptica em comparação com corantes convencionais. A solução de

AuNPs esféricas apresentam uma banda LSPR característica de aproximadamente 520 nm e cor vermelha. Esta banda é afetada pelo tamanho da partícula através do índice de refração do meio envolvente, pela forma e distância inter-partícula. O aumento do campo eletromagnético na superfície das AuNPs pela interação com a radiação eletromagnética fornece propriedades ópticas interessantes, por isso potencialmente utilizadas nos teste diagnósticos rápidos. O sucesso das AuNPs em ensaios biológicos reside na flexibilidade de métodos de síntese gerando nanopartículas com as características pretendidas, a elevada solubilidade em água, adequada morfologia, tamanho de dispersão e funcionalização da superfície (BAPTISTA et al., 2008; SPERLING; PARAK, 2010; KAVOSI et al., 2014).

Existem vários métodos de síntese de AuNPs, contudo, o mais utilizado é a redução química do óxido de ouro (III)  $Au_2O_3$ , halogenetos com estado de oxidação +1 e +3, que na presença de um agente de revestimento, isto é, um composto com a capacidade de se ligar à superfície da nanopartícula bloqueando o seu crescimento e estabilizando o coloide no solvente utilizado. O controle da forma e tamanho das nanopartículas é normalmente alcançado pela cuidadosa seleção das condições experimentais, com o agente redutor, o tempo de reação, a temperatura e o agente de revestimento com melhor afinidade para as nanopartículas, permitindo a síntese com um bom tamanho de dispersão. A redução do ouro pelo citrato de sódio segundo o método de Turkevich, é o método mais comum para a síntese de AuNPs esféricas devido à sua simplicidade e elevado rendimento. O revestimento das nanopartículas com citrato de sódio evita a agregação entre elas devido à alta densidade de carga negativa proporcionada pelos grupos carbóximo do citrato à superfície das mesmas. A funcionalização das AuNPs envolve o uso de ligantes bifuncionais, em que parte interage com a nanopartícula enquanto a outra é direcionada para o exterior da superfície para interações específicas com biomoléculas (TURKEVICH; KIN, 1970; KIMLING et al., 2006; BAPTISTA et al., 2008; SPERLING; PARAK, 2010; OMIDFAR; KHORSAND; DARZIANI AZIZI, 2013).

As propriedades ópticas das AuNPs alteram-se quando existe condução dos elétrons perto da superfície de cada partícula, ficando os mesmos deslocados, entre partículas vizinhas, levando à formação de partículas agregadas. Quando isto ocorre a banda de LSPR desloca-se para energias mais baixas, ou seja, maior comprimento de onda, na gama do amarelo, permitindo a solução ter coloração azul/violeta (OMIDFAR et al., 2010; SPERLING; PARAK, 2010).

A espectroscopia de UV-visível é um método simples e confiável para a monitorização da estabilidade das AuNPs. À medida que ocorre a instabilidade das AuNPs a banda vai diminuindo de intensidade, devido à depleção de nanopartículas estáveis. Também pode ocorrer

o alargamento da banda ou a formação de uma segunda banda a maiores comprimentos de onda, devido à formação de agregados (RECHBERGER et al., 2003; CASTAÑEDA; ALEGRET; MERKOCI, 2007; SPERLING; PARAK, 2010).

A camada de citrato ligada à superfície das nanopartículas pode ser substituída por outros ligantes com o objetivo de aumentar a sua estabilidade. Alguns exemplos são o ácido mercaptoacético, o ácido mercaptopropiônico ou o ácido mercaptoundecânico. Em meio biológico as nanopartículas podem interagir com diversas biomoléculas, tais como, proteínas, ácidos nucleicos, moléculas orgânicas, lipídios e metabólitos biológicos. A adsorção de biomoléculas na superfície das nanopartículas pode ocorrer por diversas forças, como, pontes de hidrogénio, forças de *Van der Waals*, atração eletrostática entre outras. A composição, a hidrofobicidade, a presença de grupos funcionais específicos, pH e a temperatura afetam a adsorção de proteínas à superfície das nanopartículas (SAPTARSHI; DUSCHL; LOPATA, 2013).

A bionanoconjugação entre as AuNPs e Abs pode ocorrer por adsorção, por ligação covalente entre a superfície da nanopartícula e o Abs ou recorrendo ao uso de moléculas adaptadoras. O uso de moléculas adaptadoras geralmente envolve a formação do complexo streptavidina-biotina. A vantagem da ligação covalente, quando comparada com a adsorção física é que a ligação impede a remoção competitiva dos Abs adsorvidos pelos componentes do sangue (OMIDFAR; KHORSAND; DARZIANI AZIZI, 2013; SAJID; KAWDE; DAUD, 2014).

A aplicação das AuNPs em testes LFA apresentam características distintas as quais são de extrema importância tais como a dispersão, tamanho e forma (normalmente esférica), uma vez que estas partículas devem ter mobilidade intra-teste. As partículas menores têm maior mobilidade, enquanto as partículas maiores tem uma capacidade de movimento reduzido. Estas características influenciam diretamente na sensibilidade e especificidade do teste. Há relatos na literatura da utilização dos mesmos materiais em tamanhos diferentes, mostrando resultados de testes com divergentes características (HAINFELD; POWELL, 2000; TANAKA et al., 2006; PAEK et al., 2007; LIN et al., 2008; LIU et al., 2013; MILLIPORE, 2013; OMIDFAR; KHORSAND; DARZIANI AZIZI, 2013; BIJU, 2014).

O sucesso das AuNPs em testes LFA se dá por apresentarem coloração intensa, serem de fácil sintetização e conjugação com Abs uma vez que, sem elas, seria impossível se obter os resultados imediatos e visualização ópticas, pois são elas as responsáveis pela coloração vermelha (OMIDFAR; KHORSAND; DARZIANI AZIZI, 2013).

### **2.1.6 Desenvolvendo um sensor de fluxo lateral**

O desenvolvimento de um sensor de fluxo lateral geralmente segue uma sequência que se inicia na identificação de alvos para o diagnóstico, como Ags ou Abs específicos e que possuam imunogenicidade conhecidas. A escolha de reagentes e componentes do teste são etapas importantes para o desenvolvimento de um protótipo até este ser utilizado na rotina médica e há uma gama extensa de especificidades a ser avaliada de acordo com a proteína a ser detectada (LIU; MOU, 2003; LIU et al., 2008; LIU et al., 2009; XIE; MA; LIU, 2009; TOWNSEND et al., 2013; ZHU et al., 2013).

Estudos de prova do princípio são realizados para determinar se o teste é capaz de detectar o alvo de diagnóstico pretendido (CRUZ-AGUADO; PENNER, 2008; YETISEN; AKRAM; LOWE, 2013; ROZAND, 2014).

O protótipo, então, é submetido a testagem com amostras conhecidas, chamadas “de conveniência”, quando são avaliados parâmetros de sensibilidade, especificidade e valores preditivos. Posteriormente o protótipo é submetido a avaliação com a população alvo. Os resultados destes estudos são utilizados para se obter aprovação em órgãos reguladores para que o teste possa ser comercializado. Após a aprovação e comercialização do teste, podem ser realizados estudos de aplicabilidade e implementação para demonstrar o custo-efetividade do teste (CRUZ-AGUADO; PENNER, 2008; WHO; TDR, 2010).

Embora as etapas de implantação de testes rápidos estejam bem estabelecidas, nem sempre elas ocorrem de forma rápida e prática, uma vez que os processos de padronização podem ser longos.

### **2.2 Parâmetros de avaliação e validação de testes rápidos**

A avaliação dos parâmetros ideais após a elaboração de testes rápidos é fundamental para que estes possam chegar ao mercado. O desempenho, praticidade, condições de uso, condições de armazenamento e validade, são os mais comumente considerados (KETTLER; WHITE; HAWKES, 2004).

Para análise do desempenho, são avaliados a sensibilidade e especificidade, assim como valores preditivos positivos e negativos de um teste em desenvolvimento que são fatores importantes a se considerar. É exigida alta sensibilidade de um teste a ser aplicado a doenças em que um diagnóstico negativo implica em sérias consequências na epidemiologia da doença ou para o paciente. Baixa especificidade importa menos nos casos em que o tratamento não traz

efeitos adversos graves, porém é uma desvantagem séria no caso do tratamento apresentar toxicidade, ser de alto custo e de tempo prolongado.

A praticidade do teste, está relacionada à complexidade, ao número dos procedimentos a serem realizados até à utilização do teste assim como a necessidade de processamento do material biológico utilizado como amostra, implicando em um grande tempo de manipulação até à execução e a necessidade de treinamento, supervisão, insumos e equipamentos para obtenção dos resultados (SAJID; KAWDE; DAUD, 2014).

As condições de uso e armazenamento de testes rápidos também são de extrema importância, uma vez que devem apresentar um manuseio seguro, de fácil execução, rápido, interpretação de resultados simples e não depender de equipamentos especiais ou refrigeração. Em condições de calor e umidade elevadas a predileção por testes resistentes, acondicionados em pacotes individuais com sílica, é uma prioridade.

Atendendo às exigências anteriores, a validade prolongada é um fator econômico fundamental, pois reduz a pressão na cadeia de fornecimento e a probabilidade de desperdício. Testes com validade superior a 18 meses são recomendados para atender áreas remotas e de recursos escassos.

Atendidas às exigências considera-se vantajoso e benéfico o uso destes testes rápidos. Testes de diagnóstico confiáveis e fáceis de utilizar são uma necessidade para o controle de um amplo espectro de doenças incluindo HIV-1, tuberculose, malária, leishmaniose, dengue, esquistossomose, hanseníase entre outras. Além dos testes de diagnósticos, muitas outras proteínas são fundamentais para caracterizar e monitorar os pacientes clinicamente, principalmente à beira do leito.

### **2.3 Leishmanioses**

As leishmanioses são doenças endêmicas em 98 países no mundo e segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) é a sexta endemia mais importante, e a segunda causa de morte entre as infecções parasitárias (OMS, 2013; NOGUEIRA; MONTEIRO; ESCOBAR, 2013; WHO, 2015). Cerca de 12 milhões de pessoas são clinicamente afetadas e 1,5 a 2,0 milhões de novos casos ocorrem a cada ano, sendo em média 1,5 milhões de leishmaniose tegumentar (LT) e 200.000 – 400.000, leishmaniose visceral (LV). A LT é uma doença de caráter zoonótico que acomete o homem e diversas espécies de animais silvestres e domésticos com uma enfermidade polimórfica e espectral da pele e das mucosas, podendo se manifestar sob diferentes formas clínicas (ALVAR et al., 2012; ALVES et al., 2013).

A LV é uma enfermidade generalizada, aguda ou sub aguda que acomete indivíduos de qualquer faixa etária, sendo mais frequente em crianças menores de 10 anos (54,4%) e em homens (60%). A letalidade está em torno de 10%, o que corresponde a uma média de 20.000 – 40.000 óbitos por ano (ALVAR et al., 2012). No mundo, seis países merecem atenção especial por representarem cerca de 90% da totalidade dos casos de LV, sendo eles: Índia, Bangladesh, Sudão, Sudão do sul, Brasil, e Etiópia. Nas Américas, a doença ocorre desde o sul do México até o norte da Argentina. No Brasil, sua distribuição está em 20 das 27 unidades federativas, atingindo as cinco regiões brasileiras. (ALVES, 2009; ALVES et al., 2013; ALVAR et al., 2012; BRASIL, 2016).

A preocupação com a LV vem aumentando em virtude do aumento do número de casos nas últimas décadas. Em 2000, a incidência da doença era de 1,3 casos/100.000 habitantes e passou para 1,7 casos/100.000 habitantes em 2015, já tendo chegado a 2,1 casos/100.000 habitantes em 2011. A taxa de letalidade em 2000 era 3,1% e em 2015, 7,8%. Quando comparado às quantidades de óbitos ocorridos no período de 2000 a 2008 com os últimos 8 anos, houve um aumento de 23,6%. Analisando os dados de 2015, A incidência de casos na região Nordeste continua alta, com 1.806 casos, 138 óbitos e taxa de mortalidade de 7,3%. (BRASIL, 2016).

### 2.3.1 Agente etiológico e infecção

As leishmanioses são causadas por protozoários da ordem *Kinetoplastida*, família *Trypanosomatidae*, gênero *Leishmania* (L.) (RAYMOND et al., 2012). As espécies são classificadas de acordo com a distribuição geográfica das áreas endêmicas, sendo denominadas espécies do Velho Mundo (Ásia) e Novo Mundo (Américas). O complexo *Donovani* compreende as espécies *L. donovani* e *L. archibaldi* no Velho Mundo e *L. infantum* e *L. chagasi* nas Américas (MAURÍCIO; STOHARD; MILES, 2000; LUKES et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2009).

No mundo, 20 espécies de *Leishmania* patogênicas foram registradas até o momento. No Brasil, as espécies causadoras da leishmaniose visceral fazem parte do complexo *L. donovani* e são classificadas em três espécies: *L. chagasi*, *L. infantum*, *L. donovani*, diferenciando-se por seus vetores, hospedeiros reservatórios e patologia. A espécie *L. donovani* é encontrada no subcontinente Indiano e no leste da África, a *L. infantum* na região do Mediterrâneo e a *L. chagasi* nas Américas (MAURÍCIO; STOHARD; MILES, 2000; LUKES et al., 2007).

As *Leishmanias* são transmitidas pela picada da fêmea de insetos do gênero *Lutzomya* no Novo Mundo e *Phlebotomus* no Velho Mundo e são parasitos intracelulares obrigatórios que se reproduzem por divisão binária, dentro do sistema fagocítico mononuclear de mamíferos suscetíveis (SHARMA; SINGH, 2008; RAYMOND et al., 2012).

A infecção pela *Leishmania* ocorre quando formas promastigotas infectantes são inoculadas no tecido do hospedeiro durante o repasto sanguíneo do inseto vetor. Após escaparem da lise mediada pelo sistema complemento, as promastigotas de *Leishmania* invadem rapidamente a célula alvo para iniciar a fase intracelular da infecção, já que uma vez internalizadas aos fagócitos, esses parasitos modulam o microambiente estabelecendo a infecção (DESJEUX, 2004).

No macrófago, os parasitos perdem o flagelo, tornando-se arredondados ou ovoides e são então denominadas amastigotas, formas que residem no interior dos fagolisossomos, onde sobrevivem e se multiplicam. As amastigotas são formas mais adaptadas ao pH ácido do meio e possuem enzimas como a superóxido dismutase em grandes concentrações, protegendo o parasita da ação oxidativa dos macrófagos (COURRET et al., 2002; OLIVIER; GREGORY; FORGET, 2005; DENKERS; BUTCHER, 2005). Macrófagos infectados se rompem e liberam amastigotas com potencial infectante, contaminando macrófagos vizinhos. Em um novo repasto sanguíneo, o inseto vetor ingere macrófagos infectados. Essas amastigotas, ao chegarem ao intestino do inseto, transformam-se em promastigotas e rapidamente se multiplicam. O inseto, ao exercer um novo hematofagismo, inocula formas infectantes e o ciclo se completa (SACKS; KAMHAWI, 2001; OLIVEIRA et al., 2009).

No hospedeiro mamífero a infecção propicia a multiplicação do parasito nas células do sistema fagocítico mononuclear acionando mecanismos da resposta imune.

### **2.3.2 Fisiopatologia**

Vários eventos acontecem durante a interação patógeno-hospedeiro, especialmente na infecção causada pelos parasitos do gênero *Leishmania*, os quais, ativam vários componentes do sistema imune (Figura 3). Entre eles, encontram-se os neutrófilos e células apresentadoras de antígenos (macrófagos linfócitos B e células dendríticas); a ativação do sistema complemento e a presença dos mediadores inflamatórios, como prostaglandinas e leucotrienos, desencadeiam a resposta imune inata para controle da infecção. Ao entrarem em contato com o parasito *Leishmania*, os componentes da resposta imune inata, induzem a uma resposta imune específica, desencadeando a resposta imune adquirida, onde os linfócitos T e B são os principais

atores, induzindo, desta forma, resistência contra a infecção, bem como susceptibilidade (BARRAL; COSTA, 2011).

Após a inoculação das promastigotas de *Leishmania* na pele do hospedeiro, o sistema complemento é ativado. A ativação do sistema complemento permite que o parasito seja fagocitado por vacúolos parasitóforos, que se fundem com as vesículas da via endocítica, endossomos tardios ou lisossomos da célula hospedeira, assim, os macrófagos ativam os mecanismos microbicidas, através da geração das espécies reativas de oxigênio, as quais são mediadas pelo *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase (NADPH)*, necessários para o controle do parasito. Portanto, após a internalização pelos macrófagos, promastigotas de *Leishmania* conseguem inibir a ação do fagolisossomo. O fator principal dessa inibição é o glicolípido lipofosfoglicano (LPG). Esse glicolípido tem um impacto profundo sobre o fagossoma, causando acúmulo perifagosomal de F-actina, que provoca o rompimento dos lipídeos fagolisossomais e consequentemente a inibição da ação da NADPH oxidase, dessa forma, o impedimento da formação do fagolisossomo, é a estratégia de sobrevivência dos parasitos de *Leishmania* dentro dos macrófagos (MORADIN; DESCOTEAUX, 2012).

As promastigotas metacíclicas são mais resistentes à lise e ativam a via clássica do sistema complemento pois, durante a metacicloogênese sofrem diversas modificações morfológicas, bioquímicas e fenotípicas que aumentam sua virulência e resistência. A proteção dos macrófagos, realizada por componentes gerados pela LPG, permitem a multiplicação e sobrevivência do parasito dentro do ambiente hostil do fagolisossomo. Por outro lado, as promastigotas procíclicas, são altamente sensíveis à ação da lise mediada pelo sistema complemento. Portanto, o sistema complemento, é uma das primeiras barreiras do sistema imune inato que o parasito necessita ultrapassar para que a infecção seja bem sucedida (AWASTHI; MATHUR; SAHA, 2004; ISNARD; SHIO; OLIVIER, 2012).

A lise mediada pelo sistema do complemento para o controle de patógenos é realmente importante na imunidade inata e adaptativa, uma vez que a *Leishmania* dribla à ação de lise. As promastigotas metacíclicas são capazes de inativar enzimaticamente o fragmento C3b do sistema complemento através da glicoproteína de 63 kDa (GP63), inativando o complemento C3bi. Esta inativação do sistema complemento permite a opsonização, que facilita a fagocitose, permitindo que C3bi, se ligue aos receptores do sistema complemento CR1 e/ou CR3, presentes em células fagocíticas dos macrófagos e neutrófilos, tendo como consequência a inativação da ação do complemento, portanto favorecendo a sobrevivência do parasito, conseguindo infectar outras células do hospedeiro sem causar uma resposta inflamatória à entrada do patógeno (ISNARD; SHIO; OLIVIER, 2012).

Embora, os macrófagos sejam as principais células hospedeiras para *Leishmania*, os neutrófilos migram rapidamente e em grande quantidade para o local da infecção fagocitando o parasito, ativando mecanismos microbicidas, sintetizando quimiocinas e citocinas, os quais podem propiciar o controle inicial da infecção (CHARMOY et al., 2010; MORADIN; DESCOTEAUX, 2012). Acredita-se que a atividade leishmanicida é dependente da produção de fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e elastase dos neutrófilos (AFONSO et al., 2008), mas a liberação de elastase inibe a ação imunomoduladora das células dendríticas diferenciadas a partir de monócitos humanos, já que aumentam os níveis do fator de crescimento beta (TGF- $\beta$ ) (MAFFIA et al., 2007).

A interação entre células dendríticas e patógeno, é inicializada pelo reconhecimento entre os receptores das células e os padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), incluindo lipopolisacarídeo (LPS), glicolipídios e ácidos nucleicos. Os sinais estabelecidos através dos receptores tipo *Toll* (TLRs), podem induzir a maturação celular e a produção de citocinas, proporcionando uma ponte entre a imunidade inata e adaptativa. Para a sinalização na infecção com *Leishmania* acontecer é necessário uma proteína adaptadora MyD88, a qual está implicada em várias vias dos TLR, incluindo TLR2, TLR4, TLR7 e TLR9 (VIEIRA, et al., 2013). Durante a infecção, a interação *Leishmania* células dendríticas é complexa, pois envolve uma série de eventos de sinalização celular e produção de citocinas que podem estimular ou inibir as respostas das células T, tendo como consequência o controle ou a progressão da doença (LIU; UZONNA, 2012; DE ASSIS et al., 2012). A magnitude e perfil da ativação das células dendríticas varia dependendo das espécies e cepas de *Leishmania* (MARKIKOU-OUNI; BEN ACHOUR-CHENIK; MEDDEB-GARNAOUI, 2012), das diferentes subpopulações e do estímulo exógeno (DE OLIVEIRA; BRODSKYN, 2012).

As células infectadas podem migrar da pele para órgãos como fígado, medula óssea, linfonodos e baço. Nesses órgãos, permanece a replicação do parasita. Estudos *in vitro* demonstraram que *Leishmania* pode expressar proteínas solúveis, assim os macrófagos reconhecem esse parasita como células apoptóticas e realizam a fagocitose. Em seguida, passam a sintetizar interleucina 10 (IL-10). Desta forma, os macrófagos, modulados pela *Leishmania* adquirirão um perfil regulatório/anti-inflamatório. A síntese de IL-10 é um mecanismo igualmente passível de ser usado para proteger o patógeno, evitando a sua eliminação (TRINCHIERI, 2007).

A citocina IL-10 é uma citocina diretamente envolvida na disfunção da atividade leishmanicida dos macrófagos, facilitando a persistência do parasita (ROY et al., 2015). Apesar de IL-10 suprimir a geração e a manutenção da resposta Th1, a principal atividade promotora

da doença desempenhada por IL-10 talvez seja exatamente condicionar macrófagos para aumentar a sobrevivência e o crescimento do parasita (NYLÉN et al., 2007). Quando a ação de IL-10 é neutralizada, é possível observar um aumento da secreção de interferon  $\gamma$  (INF- $\gamma$ ) e TNF- $\alpha$  (GAUTAM et al., 2011). INF- $\gamma$  é responsável por ativar a síntese do Óxido Nítrico Sintase Induzido (iNOS), responsável pela produção de óxido nítrico (NO), um potente leishmanicida do macrófago.

IL-10 também inibe a produção de algumas citocinas por macrófagos ativados e a expressão de moléculas do complexo principal de histocompatibilidade classe II (MHC classe II), resultando no bloqueio da resposta imune efetiva (BACELLAR; CARVALHO, 2005; NYLÉN; SACKS, 2007). Desta forma, IL-10 é uma citocina importante na LV, uma vez que a ação da mesma é passível de modular a atividade inflamatória pela sua atividade imunossupressora que também, pode dificultar a eliminação do parasita (ROY et al., 2015).

Níveis de IL-10 elevados no início da LV estão envolvidos no estabelecimento, na progressão da infecção (PERUHYPE-MAGALHÃES et al., 2006). IL-10 é uma citocina com possíveis efeitos sistêmicos e a sua origem celular tem mostrado afetar profundamente o resultado da regulação imune (TRINCHIERI, 2007). A citocina é secretada por vários tipos celulares, incluindo macrófagos, células dendríticas, células *natural killer*, linfócitos B, e várias subpopulações de células T. No entanto, para determinar o papel de IL-10 na LV, é importante identificar se há um tipo celular específico que seja responsável pela sua síntese e, com isso, module o sistema imunológico de tal forma a permitir a persistência da doença (GAUTAM et al., 2011).

A responsabilidade pela manutenção da LV é exercida pela ação microbicida do hospedeiro, ativada por células T efetoras por meio de Ags e fatores co-estimulatórios aos linfócitos, tais como a Interleucina-12 (IL-12), principal indutor fisiológico da produção de IFN- $\gamma$  e da diferenciação das células T em Th1 (SACKS; NOBEN-TRAUTH, 2002; SACKS; SHER, 2002; NYLÉN; SACKS, 2007). As células T, responsáveis por proteger o hospedeiro contra a *Leishmania*; tem sua ação evidenciada em estudos que mostram a interação de CD40-CD40L polarizado com células Th1, requerendo a produção de IL-12 (KAMANAKA et al., 1996). A proteção ao hospedeiro pela CD40 é atribuída a uma resposta Th1 (CAMPBELL et al., 1996; KAMANAKA et al., 1996). A interação de CD40 – CD40L estimula os macrófagos a produzirem citocinas e mediadores como o NO, o qual é o responsável por eliminar o parasito (STOUT; SUTTLES, 1996; MURUGAIYAN et al., 2007).

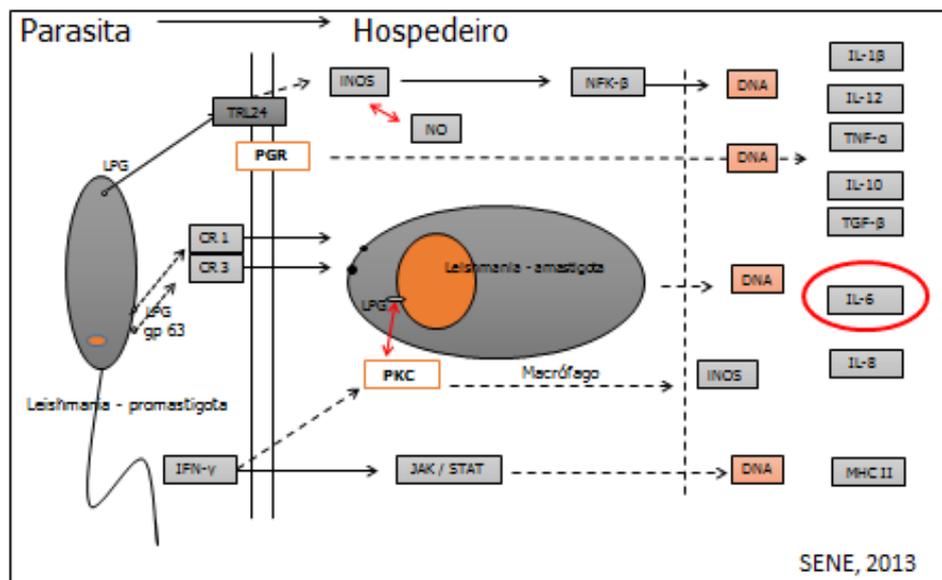
O desenvolvimento de uma resposta imune efetiva do hospedeiro contra patógenos intracelulares e o controle de sua expressão pelo parasita é intermediado pela citocina IL-12,

responsável também por permitir a sobrevivência do parasito no hospedeiro. A infecção por *Leishmania* leva à diminuição na secreção desta interleucina, sem inibir a ação de outras citocinas (MCDOWELL; SACKS, 1999). IL-12 desempenha importante papel na regulação da resposta imunológica celular *in vitro* por atuar diretamente na ativação de células T e induzir a proliferação de linfócitos e a produção de  $\text{INF-}\gamma$ , que tem sua atividade anulada pela adição de IL-10 (BACELLAR; CARVALHO, 2005; CALDAS et al., 2005).

Além do papel do parasito na inibição da produção de IL-12, os macrófagos sofrem ação das citocinas anti-inflamatórias IL-10 e  $\text{TGF-}\beta$ , que em modelos com outras doenças parasitárias tem papel importante na regulação da parasitemia e da resposta inflamatória (SACKS; SHER, 2002). A  $\text{TGF-}\beta$ , citocina supressora, na infecção pela *Leishmania*, está relacionada à capacidade de inibição de iNOS e na diferenciação de células T para o fenótipo Th1 e Th2 (GORELIK; CONSTANT; FLAVELL, 2002).

A fisiopatologia de pacientes com LV é caracterizada por um balanço imunológico que, por sua vez, poderia ser definida por um quadro clínico que induz à inibição ou estimulação *in vivo* da atividade de algumas citocinas cuja função principal consiste em ativar macrófagos, células-alvo de *L. infantum*. Além disso, a LV também caracteriza-se pela presença de inflamação sistêmica.

**Figura 3** - Esquema representativo da interação parasita-hospedeiro na infecção por *L. infantum*, ressaltando a ativação e imunossupressão de citocinas.



### 2.3.3 Citocinas

As citocinas são proteínas produzidas pela imunidade imune inata que expressam respostas imunológicas mediadas pelas vias de sinalização intracelular em resposta a infecções e inflamações sendo, portanto, considerados marcadores de imunidade (PARKIN; COHEN, 2001).

A síntese e ação de citocinas geralmente são influenciadas pela ação de outras citocinas, levando a uma cascata de ativação subsequente destas glicoproteínas. Esta ação pode mediar os efeitos biológicos das citocinas ativadas anteriormente. As citocinas, podem ter efeitos antagônicos ou sinérgicos, locais ou sistêmicos e desta forma podem alterar as expressões e funções pré determinadas de certas citocinas (WILLIAM, 2013).

As citocinas são classificadas em três categorias: reguladores da imunidade inata, reguladores da imunidade adaptativa, e estimuladores da hematopoese (KUMAR; BHATIA; PAI, 2017).

As citocinas da imunidade inata são produzidas por diferentes populações de células e agem em diferentes células alvo. Estas distinções não são absolutas, uma vez que uma mesma citocina pode ser produzida durante reações da imunidade inata ou adaptativa e diferentes citocinas podem ter ações sobrepostas. As citocinas da imunidade inata são mediadores locais ou sistêmicos da inflamação, produzidas em grande quantidade principalmente pelos macrófagos, neutrófilos e células *natural-killer* (NK) (WILLIAM, 2013).

A imunidade adquirida tem como estratégias de combate aos micro-organismos, a secreção de anticorpos que se ligam aos patógenos extracelulares e promovem a sua ingestão e subsequente destruição pelos fagócitos, o aumento da capacidade microbicida dos macrófagos por células T *helper* e a destruição das células infectadas por linfócitos T citotóxicos (WILLIAM, 2013).

#### 2.3.3.1 Citocinas na LV

Nas leishmanioses humanas o perfil de citocinas traçado e baseado em um perfil misto de citocinas envolvidos na infecção e os mecanismos de resposta imune tentam identificar fatores responsáveis pelo fenótipo de resistência e suscetibilidade a infecção pelo parasito (PERUHYPE-MAGALHÃES et al., 2006).

A resposta imune na LV ativa caracteriza-se pela elevação de citocinas com diferentes atividades pro-inflamatória, INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , interleucina 2 (IL-2), IL-6, IL-12, interleucina 17

(IL-17), e fator inibitório da migração de macrófagos (MIF), anti-inflamatória, interleucina 4 (IL-4), interleucina 5 (IL-5) e interleucina 13 (IL-13), regulatória, interleucina 1 (IL-1) e as quimiocinas, interleucina quimiotática ligante 8 (CXCL8), *macrophage chemotactic protein* (MCP) e *macrophage inflammatory protein tipo 1 beta* (MIP-1 $\beta$ ) (SANTOS-OLIVEIRA et al., 2011; KUMAR; BHATIA; PAI, 2017). Estudos distintos divergem quanto a caracterização da resposta do hospedeiro na infecção pelo parasita *Leishmania*, uma vez que pacientes com LV crônica não apresentaram resistência em cepas de pacientes tratados (DOS SANTOS et al., 2014), porém outras pesquisas sugerem que cepas de *Leishmania* resistentes, modulam o sistema imunológico produzindo citocinas (DE MOURA et al., 2016).

Diante da variabilidade de fatores que podem influenciar e caracterizar o aumento dos níveis de citocinas na LV, estudos demonstram que os níveis de IL-10, TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$ , estão associados a infecção por *Leishmania* (ANSARI; SALUJA; SALOTRA, 2006; PERUHYPE-MAGALHÃES et al., 2006; NYLÉN et al., 2007; LIMA, 2015).

O papel imunopatogênico de IL-10 tem sido observado em estudo de supressão de células T *in vitro* e resultados semelhantes foram demonstrados em níveis plasmáticos de IL-10 e IFN- $\gamma$  (CALDAS et al., 2005). Assim, IL-10 pode suprimir a actividade benéfica de IFN- $\gamma$  ativada por macrófagos infectados. Níveis séricos mais elevados de IL-10 e IFN- $\gamma$  foram evidenciados em crianças com LV grave (GAMA, et al., 2013).

Os níveis elevados de CXCL8 também parecem estar associados a infecção e características clínicas (PERUHYPE-MAGALHÃES et al., 2006; COSTA et al., 2013; LIMA, 2015), assim como os níveis de IL-6 (PERUHYPE-MAGALHÃES et al., 2006; NYLÉN et al., 2007; ANSARI; SALUJA; SALOTRA, 2006; COSTA et al., 2013; SENE, 2013; LIMA, 2015) e IL-12 (NYLÉN et al., 2007; SILVA et al., 2012).

A variabilidade de células e citocinas envolvidas na infecção pela LV e seus ativadores e estimulantes tornam difícil determinar quem predomina em relação ao desequilíbrio que a doença modula. A alteração do padrão de resposta frente as variáveis clínicas também é divergente (CALDAS et al., 2005).

A caracterização do padrão de resposta imune frente a gravidade e morte na LV também assume papel característico e por vezes, divergentes a outros padrões clínicos (COSTA et al., 2013; SENE, 2013; DOS SANTOS et al., 2016). E a concentração de citocinas é aparentemente mais elevada em pacientes com LV grave (COSTA, 2009; COSTA et al., 2013; SENE, 2013; DOS SANTOS et al., 2016), quando comparados aos pacientes que apresentam a doença sem gravidade (LIMA, 2015).

A resposta imune na LV grave parece ser caracterizada por citocinas contra regulatórias e não supressoras, evidenciando um desequilíbrio na resposta imunológica do hospedeiro, desta forma o retardo da ação profilática pode ser fatal para o doente.

### 2.3.4 Interleucina 6

A interleucina 6 (IL-6) é uma citocina multifuncional envolvida em numerosos processos biológicos, tais como a regulação da resposta inflamatória aguda, modulação das respostas imune específica incluindo as células B, diferenciação de células T, regulação do metabolismo ósseo, trombopoiese, proliferação epidérmica, diferenciação de células neuronais, neuroprotecção e caracterização de certos tipos de cânceres e doenças (SCHETT et al., 2013; HIRANO, 2014).

A IL-6 pertence às famílias de citocinas promotoras de respostas celulares por meio de um complexo da subunidade da gp 130, que é transdutora de sinal de glicoproteína para promover a ligação com o receptor de IL-6 (IL-6R), também conhecido como gp 80. IL-6 se liga a IL-6R e por dimerização se liga a gp 130 do receptor de transdução de sinal (JONES, 2005). IL-6 se liga a receptores da família *tirosina kinase Jak* ativando a via de sinalização STAT3, aumentando a expressão do gene SOCS1. Por fim, SOCS1 inibe a sinalização e a expressão de alguns genes, inibindo a síntese de INF- $\gamma$  pelos linfócitos T CD4. A ação anti-inflamatória de IL-6 induz a produção de anticorpos por células B, indiretamente, por aumentar a expressão de IL-21 em T CD4<sup>+</sup>. IL-21 estimula a síntese de anticorpos em linfócitos B através da ligação ao seu receptor (IL-21R) (HEINRICH et al., 2003; HUNTER; JONES, 2015).

Quando ativada, esta citocina induz à proliferação de células T e na presença de IL-2, induzem a diferenciação de células T CD8<sup>+</sup> em células T citotóxicas. IL-6 também está envolvida no processo de diferenciação de células Th17 e conseqüentemente na produção de IL-17 e na inibição e diferenciação de células T reguladoras (Treg). Há evidências de que a interleucina seja um fator de crescimento para queratinócitos epidérmicos, células renais, mieloma e células de plasmacitoma (GROSSMAN et al., 1989; PITTA et al., 2009).

A ativação de receptores de IL-6 ocorre por duas vias, a clássica, mediadas por IL-6R (CD126) e gp130 (CD130) na membrana e a via “*trans-signaling*” onde IL-6 solúvel (sIL-6R) se liga a IL-6 segregada para formar um complexo, cuja meia-vida é aumentada, promovendo a maior disponibilidade e circulação (ROSE-JOHN; HEINRICH, 1994; JONES; SCHELLER; ROSE-JOHN, 2011). Sabe-se que tanto IL-6 como sIL-6R estão aumentados em inflamações.

São considerados níveis normais de IL-6 (1,0 – 5,0 pg/mL) (WAAGE et al., 1989) e de sIL-6R (25,0 – 35,0 ng/mL) (JONES et al., 2001).

A citocina pró-inflamatória com função pleiotrópica, regula a resposta de fase aguda e a transição da resposta imune inata para a resposta imune adaptativa e tem como células-alvo os linfócitos B e tímócitos. IL-6 aumenta a síntese de proteínas hepáticas que estão envolvidas na fase aguda e como resposta, surgem sintomas tais como febre, calafrios e fadiga (HUNTER; JONES, 2015). A função de IL-6 não está restrita à resposta imune, uma vez que a mesma atua na hematopoiese, trombopoiese, formação de osteoclastos, resposta hepática de fase aguda, resultando na elevação da proteína C-reativa (CRP) e proteína sérica amilóide. IL-6 estimula a resposta de fase aguda hepática, resultando em um aumento da produção de CRP e consequentemente dos níveis séricos. Por este motivo, CRP é utilizada como marcador e substituto de IL-6. Assim, elevada atividade de IL-6 pode ser detectada através da medição de CRP (PEPYS; HIRSCHFIELD, 2003) no entanto, em patologias como cânceres, doenças autoimunes e algumas infecções, CRP não é considerado um marcador fiel, ressaltando a importância de IL-6 como marcador (PANICHI et al., 2004; FRAUNBERGER et al., 2006; MROCZKO et al., 2010).

Acredita-se que a IL-6 tem papel fundamental no desenvolvimento de múltiplas doenças e distúrbios, incluindo, fadiga, caquexia, doenças auto-imunes, doenças inflamatórias crônicas, doenças do sistema ósseo, doenças do coração, obesidade, diabetes, asma, Alzheimer, esclerose múltipla entre outras. Enquanto IL-6 tem ação protetora em muitas infecções a mesma atividade pode ser a responsável pela manutenção de inflamação crônica em outras patologias, (SCREPANTI et al., 1996; OHSHIMA et al., 1998).

Além de seu papel direto na patogênese de câncer e outras doenças crônicas, elevados níveis de IL-6 parecem afetar negativamente o bem-estar e qualidade de vida dos pacientes, pois resultam em caquexia, febre e redução sérica de albumina (SCHETT et al., 2013; HUNTER; JONES, 2015).

A produção de IL-6 é de responsabilidade de uma ampla gama de tipos celulares incluindo monócitos, fibroblastos, queratinócitos epidérmicos, células endoteliais vasculares, células renais, células gliais, condrócitos, células T e B além de algumas células tumorais (AKIRA et al., 1990). A citocina é a responsável por estimular as células B a secretarem Abs capazes de prevenir a apoptose celular e ativar osteoclastos, sinoviócitos, neutrófilos e outras células hematopoiéticas (YASUKAWA et al., 1987; SCHETT et al., 2013; HIRANO, 2014).

Estudos de avaliação da função cardiovascular vêm utilizando a IL-6 como importante marcador para diversas patologias cardíacas. Estudos demonstraram que leucócitos ativados

estimulam a produção de interleucinas, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ . Especialmente a IL-6, principal acionador de hepatócitos para produzir RNAm para produção de proteínas de fase aguda (fibrinogênio, CRP, amiloide sérico A) (YUDKIN et al., 2000).

Elevados níveis de IL-6 foram observados em muitos tipos de câncer, sendo eles: câncer de mama, colo do útero, colo-retal, leucemias, câncer de próstata, pancreas, pulmão e carcinoma de células renais (WEI et al, 2001; RIEDEL et al., 2005; CHUNG; CHAEN; HSU, 2006; FRAUNBERGER et al., 2006; LIPPITZ, 2013; LIPPITZ; HARRIS, 2016). Estudos clínicos mostraram melhorias nos resultados de doentes que receberam terapias anti-IL-6, principalmente nos casos de alguns cânceres, onde a terapia desempenha um papel direto inibindo a proliferação de células cancerígenas (TRIKHA, et al., 2003). A literatura relata IL-6 como um marcador precoce de inflamação pós-operatória e infecções (KRAGSBJERG; HOLMBERG; VIKERFORS, 1996; DI CESARE et al., 2005; RANDAU et al., 2014). Além disso, há evidências de que doentes com lesões cerebrais traumáticas apresentam concentrações séricas elevadas de IL-6 e são mais propensos a desenvolver sintomas crônicos (HERGENROEDER et al., 2010).

Atualmente, o desafio é identificar onde e quando a IL-6 é ativada nas inflamações a fim de compreender como o efeito pleiotrópico que determina a progressão, gravidade e duração das mais variadas doenças.

#### **2.3.4.1 IL-6 na LV**

A IL-6 na LV desempenha atividades pró-inflamatória e anti-inflamatória (LIEW; O'DONNELL, 1993) e tem como células-alvo os linfócitos B e tímócitos (DIEHL et al., 2000; DIEHL et al., 2002; LEE et al., 2016). Mesmo nos estágios iniciais da doença, a citocina está positivamente correlacionada com IL-10, fato que reforça que IL-6 também pode desempenhar uma atividade anti-inflamatória (RAMOS et al., 2016).

IL-6 é necessária para desencadear e manter ambas as respostas, Th1, Th2 e Th17 (SAMOILOVA et al., 1998; BACELLAR et al., 2009; PITTA et al., 2009; KUMAR; BHATIA; PAI, 2017). Estudos evidenciam que níveis de IL-6 e de TNF- $\alpha$  estão elevados durante a fase aguda, por ocasião das reativações de LV, em pacientes no Sudão (VAN DER POLL; ZIJLSTRA; MEVISSSEN, 1995). A citocina pode estar relacionada à produção aumentada de proteínas de fase aguda, à hipergamaglobulinemia e à indução de febre em pacientes com LV. Estas características também são evidenciadas em estudos que mostraram uma correlação positivo dos níveis de IL-6 com a CRP (PEPYS; HIRSCHFIELD, 2003).

A ação anti-inflamatória de IL-6, exercida ao inibir a diferenciação de linfócitos T CD4 no perfil Th1, inibe a produção de INF- $\gamma$ , pois IL-6 se liga a seu receptor nos linfócitos e ativa a via de sinalização *signal transducers and activators of transcription* (STAT3), aumentando a expressão do gene *suppressor of cytokine signaling 1* (SOCS1). Por fim, SOCS1 inibe a sinalização e a expressão do gene INF- $\gamma$ . Desta forma, ao diminuir a síntese de INF- $\gamma$  pelos linfócitos T CD4, IL-6 contribui para a replicação de *Leishmania* nos macrófagos. A atividade anti-inflamatória de IL-6 em pacientes com LV pode igualmente contribuir com a imunossupressão dos macrófagos, pois aumenta a imunidade humoral (DIEHL et al., 2000).

IL-6 e outras citocinas aparecem aumentadas em pacientes com LV anterior ao tratamento (DOS SANTOS et al, 2016). Recentemente, um estudo avaliando o a imunorregulação da LV em pacientes infectados por *L. donovani*, evidenciou que IL-6, juntamente com IL-17 e IL-10 são mais secretadas em pacientes curados do que em pacientes com a doença ativa. Outras populações celulares mostraram estar associadas com características clínicas (ARAUJO-SANTOS et al., 2017).

A avaliação de pacientes com leishmaniose visceral americana, causada por *L. infantum* na Amazônia evidenciou fortes associações de IL-6 e IL-10 caracterizando a imunopatogênese da doença grave e estabeleceu o papel anti-inflamatório das citocinas TNF- $\alpha$  e IL-6, e das citocinas inflamatórias IL-4 e IL-6 com a infecção (RAMOS et al., 2016).

A associação de IL-6 com os fatores de gravidade da LV estão bem estabelecidos (COSTA et al., 2010; SENE, 2013; COSTA et al., 2013, BRAZ, 2016). Sepse, sangramentos e óbito estão correlacionados e mais elevados nos pacientes que apresentavam estas características. Sene, 2013, identificou em uma análise univariada, as seguintes variáveis clínicas em associação ao óbito: hemorragia a admissão, hemorragia, sangramento gengival, epistaxe, sepse, pneumonia, icterícia, diarreia, edema, esplenomegalia, equimose e coinfeção HIV-1/*Leishmania*; carga parasitária e com as interleucinas. Estas variáveis clínicas e os níveis de citocinas foram introduzidas no modelo de regressão logística e o melhor conjunto de variáveis preditoras de morte na análise multivariada incluiu carga parasitária, IL-6 e TNF- $\alpha$ . Desta forma, entender os mecanismos imunológicos que levam a doença grave e os fatores de suscetibilidade ao desenvolvimento da mesma, passou a ser um desafio, uma vez que antecipar o tratamento em pacientes não graves, possa ser a alternativa para inibir a progressão à gravidade.

### 2.3.5 Proteína C-reativa

A proteína C-reativa (CRP) é uma proteína que reflete a resposta da fase aguda. O termo "fase aguda" refere-se a eventos locais e sistêmicos que acompanham a resposta local inflamatória que inclui vasodilatação, agregação plaquetária, quimiotaxia de neutrófilos e liberação de enzimas lisossômicas. As respostas sistêmicas incluem febre, leucocitose e uma alteração na síntese hepática de proteínas de fase aguda (HUSSAIN; KIM, 2002). A definição de proteína de fase aguda é aquela cuja concentração plasmática aumenta (proteína de fase aguda positiva) ou diminui (proteínas de fase aguda negativas) em pelo menos 25% durante distúrbios inflamatórios. Outras proteínas de fase aguda incluem proteínas de transporte (haptoglobina, ceruloplasmina, inibidor da gama 1-tripsina), proteínas de coagulação (fibrinogênio, protrombina) e componentes do complemento (C3, C4, C5) (GABAY; KUSHER, 1999).

A mensuração de CRP pode ser usada como uma ferramenta de diagnóstico para encontrar infecções clínicas, controlar os efeitos do tratamento, resultados e detecção precoce da recaída da doença e, portanto, pode ser um auxiliar de diagnóstico útil na determinação da progressão da doença (GABAY; KUSHER, 1999).

Tillet e Francis, (1930) descobriram a presença de CRP no soro de pacientes com pneumonia. O nome é derivado da capacidade da CRP em reagir com o polissacarídeo C isolado da paredes de células pneumocócicas. A proteína é um membro da família de pentraxina, sintetizada por hepatócitos, classificada como uma proteína de fase aguda com base no aumento da concentração plasmática durante a infecção e inflamação (PEPYS; HIRSCHFIELD, 2003). Pepys e Baltz (1983), relataram que a CRP é sintetizado pelo fígado em resposta a diversos estímulos inflamatórios, incluindo calor, trauma, infecção e hipóxia (ZAMBSON et al., 1985).

A função principal da CRP é a sua capacidade de se ligar à fosfocolina e reconhecer alguns agentes patogênicos estranhos, os fosfolípidos das células danificadas. CRP ativa o sistema complemento quando ligado a um dos seus ligantes e também pode se ligar a células fagocíticas, para iniciar o processo de eliminação das células alvo, por sua interação com sistemas efetores tanto humorais como celulares de inflamação. Outros efeitos pró-inflamatórios da CRP incluem a indução de citocinas inflamatórias e fator tecidual nos monócitos. A proteína também tem capacidade de prevenir a adesão de neutrófilos às células endoteliais, diminuindo a expressão superficial da L-selectina, inibindo a geração de superóxido por neutrófilos e estimulando a síntese do antagonista do receptor de IL-1 por células mononucleares (GABAY; KUSHER, 1999).

A CRP foi considerada por estimular a produção de fator tecidual de monócitos em sangue periférico humano e tem um efeito pró-coagulante. CRP recruta monócitos por quimiotaxia mediada por receptor (SLADE et al., 2003).

A concentração normal de níveis plasmáticos de CRP na maioria dos indivíduos saudáveis geralmente são 1,0 mg/L, sendo o normal definido como < 10,0 mg/L. Os níveis plasmáticos aumentam dentro de 4 á 6 horas após a lesão tecidual inicial e continuam a aumentar várias centenas de vezes dentro de 24 á 48 horas. A CRP permanece elevada durante a resposta da fase aguda e retorna ao normal com a restauração da estrutura e função dos tecidos. O aumento da CRP é exponencial, dobrando a cada 8 á 9 horas. A meia-vida é inferior a 24 horas. (RIDKER et al., 2003).

A quantidade de CRP produzida pelo corpo varia de pessoa para pessoa, e isso é afetado pela composição genética de um indivíduo (representando quase metade da variação nos níveis de CRP entre diferentes pessoas) e estilo de vida. Após a estimulação dos hepatócitos por citocinas, os níveis de CRP no sangue começam a aumentar dentro de 6 horas. Estas concentrações podem aumentar até 1000 vezes mais. O tabagismo e a obesidade estão positivamente correlacionados com os níveis de CRP, enquanto a perda de peso e a cessação do tabagismo diminuem os valores de CRP (PEPYS; HIRSCHFIELD, 2003). As pessoas com índice de massa corporal normal apresentaram diferenças na CRP média quando comparados com pessoas com massa corporal mais elevadas e diferença diminuiu com o aumento do índice de massa corporal e foi insignificante entre pessoas com obesidade grave (WILLIAMSON, 2003).

IL-6 e CRP representam os marcadores mais sensíveis utilizados para avaliar o estado inflamatório de um indivíduo (DAVE; BATISTA; VAN DYKE, 2004; RAMAMOORTHY et al., 2012). Estudos utilizam ambas as proteínas para prever o risco aumentado de desenvolver doenças cardiovasculares, arteriosclerose e certos tipos de cânceres (ISHIKAWA et al, 2000; NYSTROM, 2007).

CRP, IL-6 e neutrófilos podem contribuir, em parte para o mecanismo para as associações observadas entre infecções crônicas e doenças cardiovasculares. A CRP pode ativar complementos na parede do vaso sanguíneo danificado. IL-6 possui propriedades pró-inflamatórias e efeitos pró-coagulantes. Essas propriedades podem contribuir para a patogênese das síndromes inflamatórias sistêmicas. Além disso, IL-6 estimula a produção de CRP por hepatócitos. Os níveis elevados de neutrófilos afetam as características sanguíneas, pois se aderem as membranas endoteliais e liberam radicais de oxigênio livres e enzimas proteolíticas,

e dessa forma também contribuem para aumentar a atividade inflamatória (RAMAMOORTHY et al., 2012).

### 2.3.5.1 Proteína C-reativa na LV

A proteína C-reativa é uma proteína de fase aguda que se liga a estruturas de superfície de vários organismos incluindo a *Leishmania donovani*, alterando a função dos macrófagos. Seu papel principal na leishmaniose visceral, como em outras infecções está associado a resposta imune inata, onde por ativação do sistema complemento, macrófagos promovem opsonização e resposta protetora contra o parasita (MOLD et al., 1981; MORTENSEN; ZHONG, 2000). Um exemplo é a opsonização de CRP pela absorção subsequente de *Streptococcus pneumoniae* em camundongos, resultando no aumento da bactéria, e proteção contra a infecção (SZALAI; BRILES; VOLANAKIS, 1996).

Estudos *in vitro*, evidenciaram que a CRP liga-se a carboidratos, a fosforilcolina, na superfície de organismos como *S. pneumoniae* e as glicoproteínas do carbono fosforilado na superfície de *L. donovani* metacíclico (CULLEY et al., 1996; CULLEY et al., 2000). Além disso, demonstrou-se que CRP liga-se a promastigotas metacíclicas de *L. mexicana*, desencadeando a transformação para o estágio de amastigota, independente da temperatura e da mudança de pH (BEE et al., 2001). Outro estudo *in vitro*, demonstrou que a *Leishmania* pode usar a CRP para modular a infecção sem prejudicar a ação dos macrófagos (BODMAN-SMITH et al., 2002).

Em seres humanos, níveis CRP frente a infecção pela LV, apresentam um aumento de até 1000 vezes em 24 horas, para a inflamação severa (GASIM; THEANDER; ELHASSAN, 2000). Níveis de CRP são utilizados como controle da LV em pacientes com tratamento, evitando procedimentos invasivos. (WASUNNA et al., 1995; SINGH et al., 1999). Pacientes com LV com níveis elevados de CRP pós tratamento apresentam mais chance de desenvolver lesão dermal pós Calazar (PKDL) (GASIM; THEANDER; ELHASSAN, 2000).

Na Índia, níveis de CRP foram utilizados para correlacionar quantidade de parasitas no baço. Crianças infectadas por LV apresentaram valor médio de CRP de 62,9 mg/L, enquanto que os controles saudáveis apresentaram 3,34 mg/L. Após 10 dias de tratamento, evidenciou-se redução nos níveis de CRP em 91% das crianças. A correlação com as biopsias de baço evidenciou que 62% das crianças com níveis inferiores a 12,0 mg/L não apresentaram parasitas. No entanto, 92% das crianças que apresentaram parasitas no baço apresentaram níveis de CRP superior a 12,0 mg/L (SINGH et al., 1999).

### 2.3.6 Patogenia

A LV é uma enfermidade generalizada, caracterizada pelo comprometimento de células do retículo endotelial onde os parasitos crescem se multiplicam e disseminam de forma descontrolada. Assim, as reações patológicas consequentes à infecção são mais proeminentes em órgãos como fígado, baço e medula óssea (BASILEIRO FILHO, 2000; FRANCO et al., 2010).

O comprometimento hepático reflete o tipo de resposta imune gerada pelo parasito. Normalmente, se nota um aumento de volume do órgão, hiperplasia e hipertrofia das células de *Kupffer*. O aumento de volume ocupa grande parte da cavidade abdominal, deslocando outros órgãos. Os hepatócito normalmente não parasitados e os espaços porta são expandidos por infiltrado linfocitário, plasmócitos e macrófagos (DUARTE; MARIANO; CORBETT, 1989; BASILEIRO FILHO, 2000; FERREL; KAKAR, 2011).

O baço apresenta hiperplasia e hipertrofia das células retículo endoteliais com presença de macrófagos parasitados. Os sinusóides e cordões de *Bilroth* exibem ligeira plasmocitose. Na polpa branca há uma diminuição seletiva dos linfócitos T, com surgimento de plasmócitos e macrófagos (BASILEIRO FILHO, 2000; FERREL; KAKAR, 2011).

A medula óssea apresenta-se normalmente hipocelularidade granulocítica e hiper celularidade eritrocítica, com predomínio de micro-eritroblastos. Os macrófagos parasitados estão aumentados em número e volume. Os plasmócitos aparecem de forma agrupada com multinucleações (COTTERELL; ENGWERDA; KAYE, 2000; BRASILEIRO FILHO, 2000).

Pacientes com LV apresentam ainda comprometimento pulmonar, renal e intestinal (DUARTE; MARIANO; CORBETT, 1989; DUTRA et al., 1985; MUIGAI et al., 1983; BRASILEIRO FILHO, 2000).

### 2.3.7 Caracterização clínica da LV

Clinicamente, pacientes com LV apresentam febre irregular e de longa duração, hepatoesplenomegalia, anemia com leucopenia, hipergamaglobulinemia e hipoalbuminemia, emagrecimento, edema e estado de debilidade progressivo, levando à caquexia e, até mesmo, ao óbito (PEARSON; SOUSA, 1996; BADARÓ; DUARTE, 1996; HERWALDT, 1999; GAMA et al., 2004; DE ASSIS et al., 2012; SELVAPANDIYAN et al., 2005).

A evolução das formas clínicas é diversa, podendo o indivíduo apresentar desde formas assintomáticas (raro), formas oligossintomáticas com cura espontânea, formas com manifestações graves, podendo alcançar letalidade entre 10% e 98% em casos tratados inadequadamente e não tratados, respectivamente (GONTIJO; MELO, 2004; ALVARENGA et al., 2010).

As formas sintomáticas, apresentam sinais clássicos da doença, como: febre e hepatoesplenomegalia e na maioria dos casos, icterícia, acometimento renal e sangramentos. Esses pacientes apresentaram palidez cutânea e de mucosas, fraqueza, adinamia, relato de perda ponderal, e anorexia (COSTA et al., 2010; CHANDRA; CHANDRA; KAUSHIK, 2013).

Na LV grave observa-se as características: falência respiratória, edema, tosse, vômito, infecções bacterianas, diarreia, convulsões, adinamia, inapetência, sonolência, hemorragias e sepse (COSTA, 2009; BELO et al., 2014). Outro fator que deve ser considerado importante em relação a doença grave é a idade. Lactentes com menos de 1 ano e os adultos entre 50 e 60 anos, assim como os co-infectados HIV-1/*Leishmania*, apresentaram maior letalidade (COSTA, 2009; COURA-VITAL et al., 2014).

Essa classificação da LV de acordo com a gravidade do quadro clínico pode estar relacionada com o desenvolvimento de uma resposta inflamatória sistêmica que contribui com anormalidades na hemostasia (COSTA, 2009). Os distúrbios da coagulação são relevantes porque quanto maior o número de sítios de sangramentos apresentados pelos pacientes, maior será gravidade da LV (COSTA et al., 2013). Essa situação clínica associada a imunoparalisia é propícia para a instalação de infecções bacterianas (COSTA et al., 2010), complicação que aumenta a taxa de mortalidade (SARKARI et al., 2016).

No Piauí, alguns estudos clínicos dão importantes suportes à literatura. A avaliação clínica de trezentos e oitenta e seis pacientes identificou anemia grave, febre por mais de 60 dias, diarreia e icterícia como fatores de predição de óbito, com uma taxa de letalidade de 4,4% (WERNECK et al., 2003). Em 2009, Costa et al., avaliou o perfil clínico de 883 pacientes e a letalidade geral foi de 7,5% com associação a fatores como infecções bacterianas, diarreia, edema e sangramentos. Este mesmo estudo sugere associação com citocinas pro-inflamatórias (COSTA, 2009). Costa et al. (2010) estudaram 396 pacientes e apontaram a infecção bacteriana e o sangramento como eventos que levaram 72 pacientes à morte. Para infecção bacteriana, cinco fatores de risco foram únicos para morte (desnutrição, alterações pulmonares, anemia grave, neutropenia grave e número de leucócitos aumentados), enquanto seis foram exclusivos para morte por sangramento (icterícia, neutropenia relativa grave, trombocitopenia grave, lesão hepática, insuficiência renal, maior carga de parasitas na medula óssea).

No Nordeste, outros estudos com crianças e adolescentes mostraram que a causa do óbito está relacionada com infecções, hemorragias, insuficiência hepática, edema e icterícia (QUEIROZ; ALVES; CORREIA, 2004; SAMPAIO et al., 2010). Sabe-se que mesmo em tratamento 5,0 – 10,0% dos pacientes vão a óbito e os fatores não são bem conhecidos (SEAMAN et al., 1996). No Brasil ocorrem, em média, 240 mortes por ano (ALVARENGA et al., 2010; BRASIL, 2016).

As milhares de mortes têm ocorrido principalmente em decorrência da iatrogenia e de fatores que levam ao agravo do quadro clínico, como infecções bacterianas, associação com comorbidades e infecções oportunistas como o HIV-1 (ALVAR et al., 1997; MONTALBÁN et al., 1989; KADIVAR, et al., 2000; MUELLER et al., 2009; ALVARENGA et al., 2010). A combinação de LV e HIV-1 é devastadora, pois a sinergia faz com que o vírus iniba a ação das células CD4, limitando a capacidade de controle do sistema imune e permitindo a disseminação do parasito. Alterações no perfil de citocinas em pacientes com LV sugerem coinfeção com HIV-1. Nestes casos, as manifestações clínicas são atípicas e o tratamento menos efetivo (GRADONI; SCALONE; GRAMICCIA, 1993; PINTADO; LÓPES-VÉLEZ, 2000; PINTADO et al., 2001; MOLINA; GRADONI; ALVAR, 2003).

Pacientes co-infectados por HIV-1/*Leishmania* apresentam maior morbidade e letalidade, portanto a infecção desses pacientes pelo vírus pode ser considerado um parâmetro de gravidade (COSTA, 2009; COSTA et al., 2010). No entanto, pacientes com LV que tiveram sangramento apresentaram um *score* de gravidade maior do que dos pacientes co-infectados com HIV-1 (COURA-VITAL et al., 2014).

O desenvolvimento do software KalaCal<sup>®</sup> para cálculo do score de gravidade, ou seja, a probabilidade de morte dos pacientes com LV, veio agregar clinicamente os pacientes com LV, uma vez que identificar fatores que levam ao agravo clínico possa ser a solução para impedir a alta mortalidade (COSTA et al., 2016).

O desafio para impedir que os pacientes com LV cheguem a gravidade, e identificar os fatores clínicos e imunológicos, prévios ao agravamento da doença, que possam prever a doença grave. O desenvolvimento e aplicação destes testes rápidos imunológicos, podem ser considerados peça fundamental para a triagem dos doentes que tem maior probabilidade de morte, intensificando monitoramentos clínicos e antecipando terapias, evitando o estado de debilidade progressivo com hemorragias, infecções bacterianas, sepsis e conseqüentemente o óbito.

## 2.4 Software de leitura para dispositivos móveis

Os telefones celulares, especialmente os *smartphones*, são as ferramentas móveis mais utilizadas. Aproximadamente 1,75 bilhões de pessoas usam estes dispositivos cotidianamente, no mundo, e estima-se um crescimento de 2,03 bilhões (28% da população do mundo) até 2018 (MOBITHINKING, 2014).

Os dispositivos móveis, *smartphones*, tem sido amplamente associados aos sistemas de detecção dos sensores de fluxo lateral, *chips* de sensores eletroquímicos, testes bioquímicos e outros testes com possível detecção manual (ZHANG et al., 2015). A aplicação é usada para identificação de microorganismos celulares via microscopia (LEE; YANG, 2014), microscopia de fluorescência para detecção de *Salmonella*, *E. coli* e HCMV (CUI et al., 2013; NICOLINI; FRONCZEK; YOON, 2015) e medidas de intensidade colorimétricas para pH, glicose, cortisol na saliva e explosivos entre outros (SHEN; HAGEN; PAPAUTSKY, 2012; CHUN et al., 2014; SALLES et al., 2014; ZANGHERI et al., 2015).

Programas de aplicação, do inglês, *application program* (App) são dispositivos construídos com multifunções e são considerados controladores, analisadores e reprodutores rápidos para monitoramento em tempo real simplificando metodologias, reduzindo custos e tempo em relação aos sistemas de detecção tradicionais. (ZHANG et al., 2015; ZHOU et al., 2015).

A principal função destes sistemas operacionais é o monitoramento, cuja função mais importante é obter o reconhecimento e transformar a detecção em informação imediata e muitas vezes com transmissão e transferência de informações instantâneas (MOBITHINKING, 2014; ZHANG et al., 2015).

A alta resolução das câmeras que equipam os *smartphones*, é o grande trunfo para o desenvolvimento de tecnologias capazes de auxiliar na interpretação de dados gerados por biossensores e sensores químicos, onde o método de detecção mais comum é a óptica (SKANDARAJAH et al., 2014; ZANGHERI et al., 2015).

As primeiras ferramentas de interpretação de dados sanguíneos e de microorganismos simulando um microscópio, foram passos iniciais para o desenvolvimento de tecnologias que pudessem ser associados a outras áreas de diagnóstico (BRESLAUER et al., 2009).

Atualmente com o avanço das tecnologias de imagens, as resoluções em nanoescala permitiram os dispositivos móveis utilizarem este compacto equipamento para detectar nanopartículas, vírus e DNA. A microscopia de imagem, fluorescente ou colorimétrica, onde o método de detecção é desenvolvido por intensidade de luz, a precisão das informações são

facilmente transformadas em medidas quantitativas ou qualitativas não subjetivas (TSENG et al., 2010; NICOLINI; FRONCZEK; YOON, 2015).

Os métodos de detecção colorimétrica em especial, são os mais reportados na literatura, uma vez que os métodos semi-quantitativos de cores produzidos, podem ser facilmente convertidos em escala numérica (SHEN; HAGEN; PAPAUTSKY, 2012). Esta perspectiva, veio solucionar possíveis problemas para a subjetividade de métodos colorimétricos semi-quantitativos (ZHOU et al., 2015; ZHANG; LIU, 2016; DONG et al., 2017).

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivos gerais

- ✓ Desenvolver um dispositivo simples para detecção rápida da IL-6 e identificação de pacientes com leishmaniose visceral grave.

#### 3.2 Objetivos específicos

- ✓ Identificar os materiais ideais para o desenvolvimento do sensor LFA;
- ✓ Padronizar o teste LFA para IL- 6;
- ✓ Desenvolver um perfil colorimétrico a partir da curva padrão com a proteína IL-6 recombinante;
- ✓ Comparar as medidas realizadas no dispositivo LFA com a citometria de fluxo;
- ✓ Correlacionar fatores de gravidade da LV com IL- 6 e proteína C reativa;
- ✓ Gerar um produto com características comerciais;
- ✓ Testar o desempenho do produto nos pacientes com LV;
- ✓ Confirmar a sensibilidade e especificidade do produto;
- ✓ Desenvolver *softwares* de leitura para dispositivos móveis.

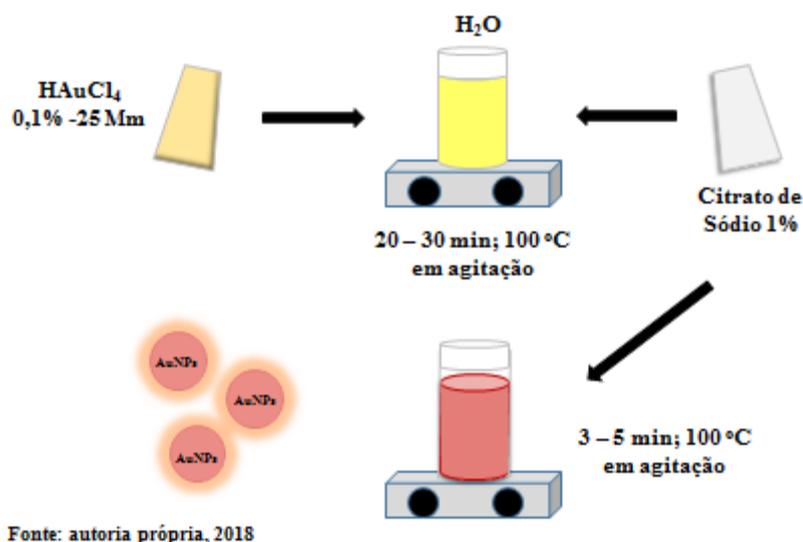
## 4 METODOLOGIA

### 4.1 Desenvolvimento do protótipo – Quick-IL test (IL-6)

#### 4.1.1 Solução de Nanopartículas de ouro coloidal

O preparo das nanopartículas de ouro se deu a partir do cloreto de ouro III ( $\text{HAuCl}_4$ ). Foi utilizado para preparação da solução coloidal 0,1% ( $\text{HAuCl}_4$ ) a 25 mM. Utilizou-se aquecimento e agitação até atingir 100 °C. O processo de redução das AuNPs foi realizado com citrato de sódio 1%, a concentração desta, influencia diretamente no tamanho das AuNPs. Nesta concentração, obteve-se AuNPs com diâmetros de 10 a 16 nm. Ao final da fervura, 5 a 10 minutos, a solução incolor mudou de coloração. Primeiramente para violeta e depois vermelho. Após adquirir a coloração vermelha, aguardou-se 5 minutos e foi resfriado em temperatura ambiente. A solução foi guardada a 4 °C protegida de luz, figura 4.

**Figura 4.** Esquema ilustrativo do preparo das nanopartículas de ouro em solução coloidal.



#### 4.1.2 Teste de agregação AuNPs/Anti-IL-6

O teste de agregação foi realizado em placa com 96 poços contendo 150,0  $\mu\text{L}$  de solução AuNPs, pH 9. Dez microlitros de Abs anti-IL-6 diluído em água nas concentrações de 0, 1,0  $\mu\text{g/mL}$ , 5,0  $\mu\text{g/mL}$ , 20  $\mu\text{g/mL}$ ; 200,0  $\mu\text{g/mL}$ ; 400,0  $\mu\text{g/mL}$ ; 600,0  $\mu\text{g/mL}$  e 800,0  $\mu\text{g/mL}$ , foram

adicionados aos poços contendo AuNPs. Após agitação por 20 min á 600 rpm, adicionou-se aos poços 20,0 µL de NaCl a 10%, exceto em apenas um dos poços, que continha apenas AuNPs. Os testes foram realizados em duplicatas para as concentrações estabelecidas.

#### **4.1.3 Solução do conjugado - AuNPs/Anti-IL-6**

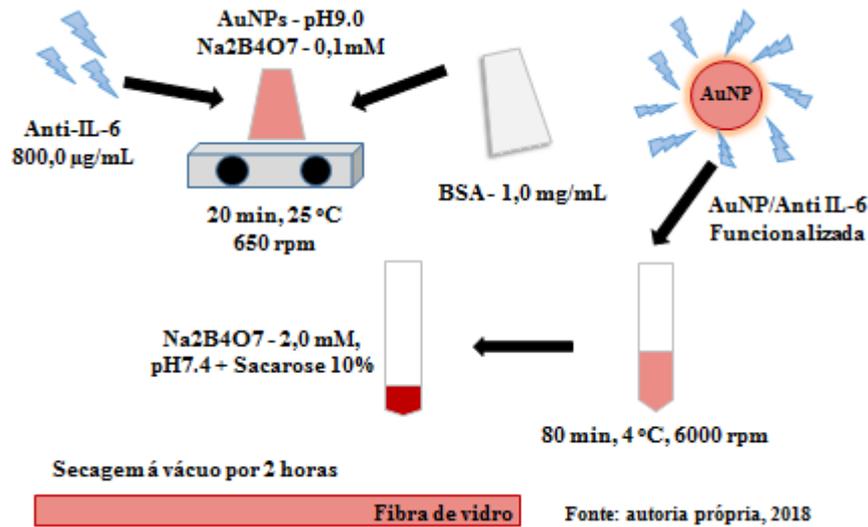
As etapas de preparo da solução do conjugado e membrana do conjugado estão representadas na figura 5.

A solução do conjugado foi preparada a partir da solução coloidal de AuNPs, pH 9.0, acrescida de tampão borato de sódio 0,1 mM com pH 9.2. Foram adicionadas à solução anticorpo monoclonal “*anti human IL-6*” (anti-IL-6) (Abcan Plc – Cambridge, Reino Unido) a fim de serem testadas as melhores concentrações (200,0 µg/mL; 400,0 µg/mL; 600,0 µg/mL e 800,0 µg/mL) para análise da melhor qualidade do preparo do conjugado. A solução foi incubada por 20 minutos, 650 rpm à 25 °C. Após a incubação, foi adicionado solução de soro albumina bovina (BSA) (1,0 mg/mL) para isolamento dos sítios livres presentes nas AuNPs e novamente incubado por 20 minutos, 650 rpm a 25 °C. O volume total da solução foi centrifugado por 80 minutos, 6000 rpm a 4 °C. O precipitado foi ressuspendido em 500,0 µL de tampão borato de sódio na concentração de 2,0 mM, pH 7.4, acrescido de sacarose 10%, figura 5.

#### **4.1.4 Membrana suporte do conjugado - “*Conjugation pad*”**

A membrana do conjugado escolhida neste experimento foi a membrana de vidro (Glass Fiber Conjugate Pad - GFPC000800 – EMD Merck Millipore KGaA – Darmstadt, Alemanha). A impregnação da solução do conjugado, previamente descrita, na fibra de vidro foi realizada por imersão. Tiras de 15 – 20 cm foram cortadas e delicadamente enroladas em uma pinça fina para absorção da solução. Para secagem as mesmas foram mantidas o vácuo por 2 horas (*Glove Box Workstation* -MBRAUN GmbH, Germany).

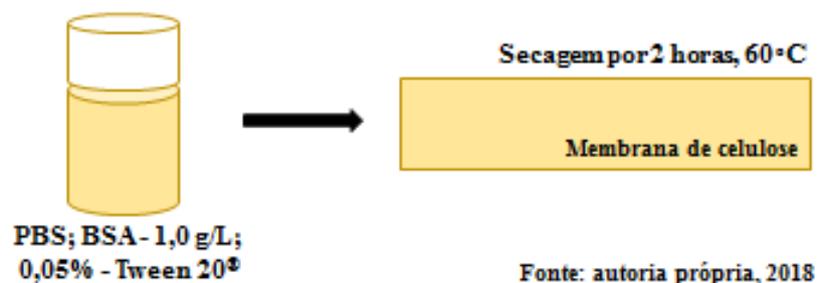
**Figura 5.** Representação esquemática ilustrativa da conjugação de nanopartículas de ouro em solução coloidal com anticorpo anti-IL-6 e preparo da fibra de vidro (imersão à secagem) para montagem do teste rápido.



#### 4.1.5 Membrana receptora de amostra - “Sample pad”

A membrana receptora de amostra é uma membrana de celulose cuja função é absorção e controle do fluxo da amostra. Para melhor desempenho, as membranas (Cellulose Fiber Sample Pad Roll - CFSP001700 / C083 – EMD Merck Millipore KGaA – Darmstadt, Alemanha) foram pré-tratadas com PBS, acrescido de BSA na concentração de 1,0 g/L e Tween 20<sup>®</sup> 0,05%. Para secagem, as membranas foram mantidas em estufa a 60 °C por 2 horas, figura 6.

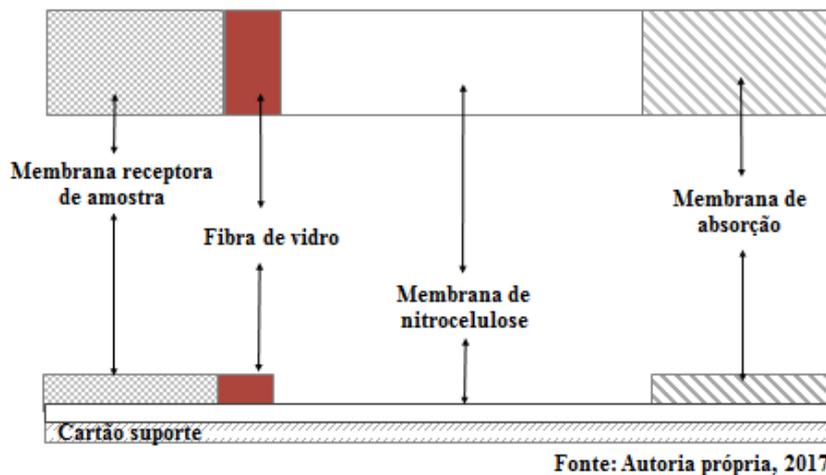
**Figura 6.** Representação esquemática ilustrando o pré-tratamento da membrana de celulose, membrana receptora da amostra para montagem do teste rápido



#### 4.1.6 Construção do teste rápido – *Quick-IL test (IL-6)*

O teste LFA para a IL-6 foi montado a partir das tiras previamente preparadas e descritas acima, utilizando as membranas *Hi-Flow Plus Membranes* (EMD Merck Millipore, KGaA – Darmstadt, Alemanha). Para desenvolvimento deste sistema, foram utilizadas 4 diferentes membranas, a base de celulose, sendo elas: membranas receptora ou filtro da amostra “*sample pad*” e membrana de absorção, “*absorbant pad*”; membrana de fibra de vidro “*conjugation pad*” e membrana de nitrocelulose “*detection pad*”, conforme demonstrado na figura 7.

**Figura 7.** Representação esquemática demonstrando a montagem do teste rápido para interleucina 6 por sobreposição das membranas que compõem o teste.

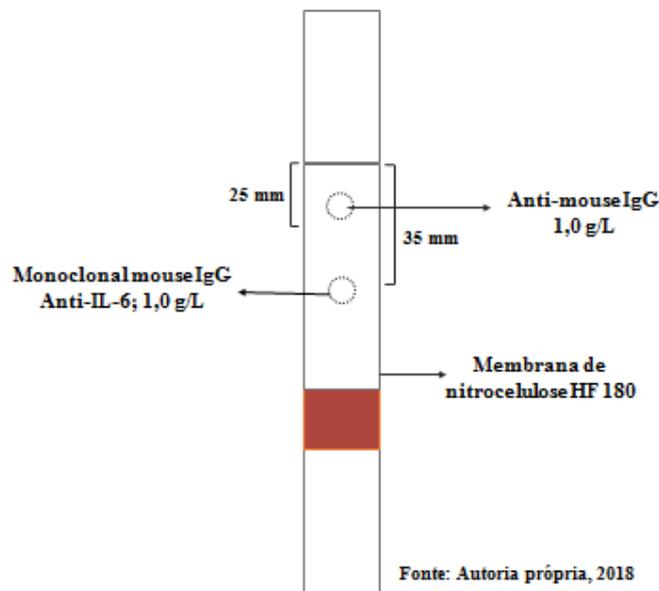


#### 4.1.7 Imobilização do anticorpo na membrana de nitrocelulose

A membrana utilizada na linha de detecção ou linha de teste foi a membrana de nitrocelulose (SHF1800425, EMD Merck Millipore KGaA – Darmstadt, Alemanha) classificada como de alto fluxo e encontram-se disponíveis no mercado como *Hi-Flow* (HF), e varia de 65 a 180 segundos por 6 centímetro de membrana. Para melhor reatividade, os mais recomendados são de alto fluxo de 135 e 180 (HF135 e HF180). A imobilização do anticorpo na superfície da membrana de nitrocelulose foi realizada por meio de adsorção física em membranas, HF180. A membrana foi cortada em tiras de 0,5 cm onde foram fixados os anticorpos de captura: anticorpo primário, Monoclonal *mouse* IgG anti-IL-6 (1,0 g/L) (Abcan Plc – Cambridge, Reino Unido) caracterizando o ponto de teste e o Abs secundário (ponto de controle), *anti-mouse* IgG (1,0 g/L) (R&D Systems, a Biotechne Brand, Mineápolis, USA)

foram imobilizados a 35 mm e 25 mm, respectivamente, a partir da extremidade superior da tira. Para obter um padrão de imobilização homogêneo e delimitado, 1,0  $\mu$ L das soluções de Abs foram cuidadosamente adicionados utilizando micropipeta. As tiras foram secas em temperatura ambiente por 60 minutos, figura 8.

**Figura 8.** Representação esquemática de um teste LFA em nitrocelulose HF180, com anticorpos imobilizados a 25 e 35 mm respectivamente, pronta para utilização.



#### 4.1.8 Curva padrão colorimétrica

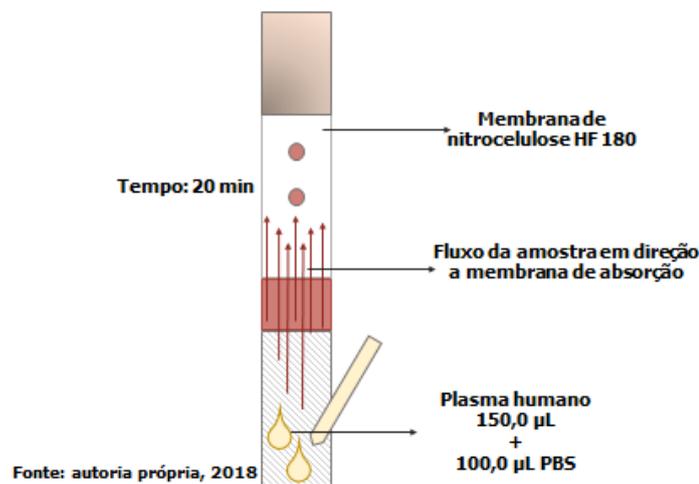
Para realização da curva padrão, utilizou-se a proteína IL-6 recombinante (R&D Systems, a Biotechne Brand, Mineápolis, USA). Diluições seriadas para as concentrações: 10.000, 5.000, 2.500, 1.000, 500, 250, 100, 50 e 10 ng/mL e 10.000, 5.000, 2.500, 1.000, 500, 250, 100, 50 e 10 pg/mL foram realizadas em solução de PBS com 0,05% Tween 20<sup>®</sup> e PBS com adição de 0,01% Tween 20<sup>®</sup>. Após a padronização com as concentrações em ng/mL, tentamos baixar o limite de detecção para pg/mL.

Nas tiras em duplicatas, foram adicionados, 100,0  $\mu$ L da solução contendo as diferentes concentrações de IL-6. Após 5 minutos, novamente foram depositados 100,0  $\mu$ L de PBS para lavagem da membrana. Após 20 minutos as tiras foram fotografadas e arquivadas.

#### 4.1.9 Protocolo de execução do teste rápido *Quick-IL test (IL-6)*

Amostras de plasma na quantidade de 150,0  $\mu\text{L}$  foram adicionadas as tiras de teste por 5 minutos. Para melhorar o fluxo das amostras na tira, foram adicionados 100,0  $\mu\text{L}$  de solução de lavagem (PBS). Neste procedimento pode-se observar o fluxo da amostra através de uma linha de coloração rosa movendo-se em direção das zonas de teste e controle. A leitura dos resultados foi realizada visualmente após 20 minutos, figura 9.

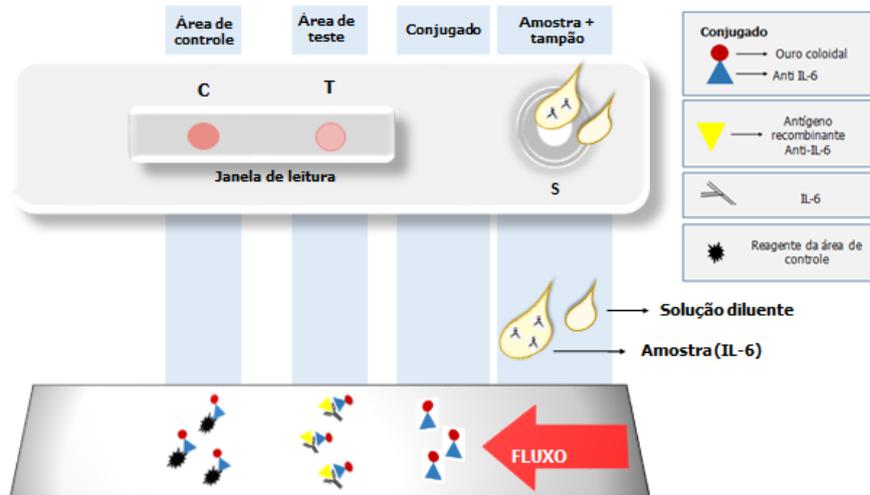
**Figura 9.** Representação esquemática do fluxo de plasma humano no teste rápido para IL-6.



#### 4.1.10 Protocolo de interpretação do teste rápido *Quick-IL test (IL-6)*

Nesta tese, foi utilizado o teste rápido no formato sanduíche. O plasma humano foi adicionada à membrana receptora de amostra. O Ags presente na amostra (IL-6), entra em contato com o conjugado (AuNPs/Anti-IL-6), reconhecendo a proteína IL-6, formando o complexo (AuNPs/Anti-IL-6/Ags) que são arrastados por capilaridade através da membrana até o ponto de teste (T) (Figura 10). O Abs de captura, Anti-IL-6, previamente imobilizado na membrana forma o complexo denominado sanduíche (AuNPs/Anti-IL-6/Ags/Abs primário). A marcação de controle, contendo um Abs secundário, Anti-mouse IgG, se liga ao excesso de conjugado AuNPs/Anti-IL-6 evidenciando a marcação no ponto controle (C), indicando a funcionalidade do teste.

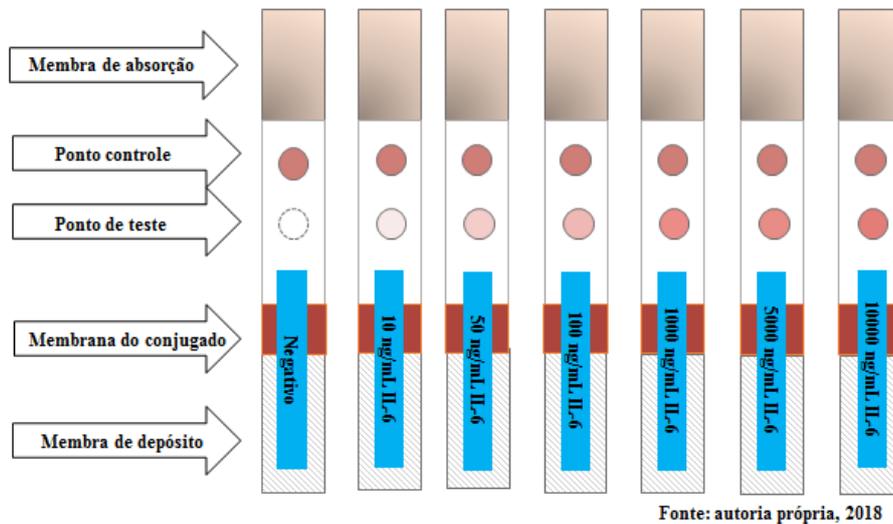
**Figura 10.** Representação esquemática do teste rápido no formato sanduíche a partir da ligação da proteína IL-6 com o conjugado (AuNPs/Anti-IL-6), que através do fluxo, chega ao ponto de teste (T) formando o sanduíche com o anticorpo Anti-IL-6 primário. A segunda marcação, representada pela zona de controle (C) evidencia a ligação do reagente da área de controle (Anti-mouse IgG), anticorpo secundário, que se liga ao *Mouse* AuNPs/Anti-IL-6, caracterizando a funcionalidade do teste com a marcação pontual de controle positivo.



Fonte: Autoria própria, 2018

O teste rápido para IL-6 só é válido se houver coloração do ponto controle. A ponto de teste deverá corar com tonalidades variáveis de rosa, o que revela a presença da proteína IL-6, em concentrações variáveis nas amostras testadas (BÜHRER-SÉKULA et al., 2003). O resultado negativo é indicado pela ausência pontual na faixa do teste e a presença de um ponto na faixa de controle (Figura 11). Como a proteína testada deve estar presente em todos os indivíduos, mesmo que em baixas concentrações, todos os testes devem apresentar as duas marcações pontuais. A intensidade de coloração entre as faixas criadas, de acordo com as diluições conhecidas, faz do sensor um teste quantitativo.

**Figura 11.** Representação esquemática do teste rápido no formato sanduíche negativo e positivo em diferentes concentrações para a IL-6.



#### 4.1.11 Caracterização das nanopartículas de ouro

As AuNPs foram caracterizadas recorrendo à espectroscopia de UV-Visível (USB4000 Fiber Optic Spectrometer – Ocean Optics – FL, USA). Todos os espectros foram traçados na gama de comprimentos de onda entre 300 e 900 nm em cubetas de quartzo com 1,0 cm de percurso óptico. No espectro de UV-Visível, a solução coloidal de AuNPs apresenta uma banda LSPR característica com um máximo de absorbância a cerca de 520 nm. De acordo com os parâmetros utilizados na síntese espera-se obter nanopartículas esféricas com um diâmetro médio entre 14-20 nm.

Para obtenção das imagens digitais, utilizou-se a microscopia eletrônica de transmissão (MET). Uma gota de 5,0  $\mu\text{L}$  da solução contendo as AuNPs foi colocada sobre uma grade de cobre e recoberta com um filme de carbono com espessura de 20 a 30 nm. A amostra foi seca à temperatura ambiente durante 16 horas.

O microscópio eletrônico de escolha foi o Morgagni™ TEM, que opera a 80 kV, de propriedade do Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME) do Instituto de Física da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC).

## **4.2 Desenho do estudo epidemiológico**

### **4.2.1 Design**

Trata-se de um estudo de coorte prospectivo, onde os resultados em pesquisa básica, serão aplicados na rotina diagnóstica em serviço de saúde pública.

### **4.2.2 População alvo**

Pessoas com LV causada por *L. infantum*.

### **4.2.3 População fonte**

Pessoas com suspeita de LV do Instituto de Doenças Tropicais Natan Portella (IDTNP).

### **4.2.4 População de estudo**

Pessoas com diagnóstico de LV confirmado por pesquisa direta de amastigotas e/ou cultura positivos atendidos no IDTNP, Teresina, Piauí, Brasil, entre abril e setembro de 2015.

### **4.2.5 Critérios de inclusão**

Pessoas de ambos os sexos e de todas as idades, diagnosticados por LV.

### **4.2.6 Definições**

Considerou-se caso os pacientes de ambos os sexos, todas as idades com diagnóstico confirmados de LV por pesquisa direta e/ou cultura de amastigotas, que apresentavam evidências clínicas sugestiva de LV como: febre e esplenomegalia.

Os parâmetros clínicos dos pacientes com LV avaliados, além de variáveis demográficas (idade e sexo) e estados nutricionais (relato de perda de peso, percentual de peso perdido), foram: relato de febre, febre > 39 °C, tempo de duração da febre, palidez, tamanho do baço, tamanho do fígado, irritabilidade, fadiga, vômito, sonolência, falta de apetite, diarreia, dor abdominal, tosse, falta de ar, oligúria, edema, sangramentos, icterícia, dispneia, raios-x de pulmão normal, esplenomegalia, hepatoesplenomegalia, infecção do trato urinário,

insuficiência renal crônica, pneumonia, sepse, coinfeção HIV-1/*Leishmania* e parâmetros hematológicos.

Foi considerado sangramento, qualquer relato ou avaliação dos seguintes parâmetros: qualquer sangramento à admissão, sangramento gengival, sangramento digestivo, petéquias, equimose, epistaxe e sangramento superficial de venóclise. O sangramento a admissão foi relato do pacientes e não ao exame clínico. A variável hemorragia considerou qualquer tipo de sangramento e sangramentos em mais de um sítio.

Considerou-se febre, um aumento de temperatura superior a 37,5 °C. Utilizou-se o parâmetro tempo de febre relatado para considerarmos como tempo da doença.

A pneumonia foi diagnosticada com a presença de febre e exame de raio-x de tórax ou tomografia com o diagnóstico definido.

As infecções bacterianas foram consideradas através de culturas positivas.

Considerou-se sepse a presença de hiperventilação, hipoperfusão tecidual, saturação venosa, oligúria e alteração de consciência.

A medida do baço considerada foi pela maior extensão, do bordo costal em direção à ponta esplênica.

#### **4.2.7 Considerações sobre a amostra**

Foram considerados amostra 235 participantes, consecutivos, com suspeita de LV que tiveram sangue coletados prévio ao diagnóstico e início de intervenção terapêutica.

Todos os pacientes foram submetidos à anamnese e ao exame físico por médicos envolvidos na pesquisa de acordo com questionário estruturado (Anexo 7) nas primeiras 48 horas da internação, independente de confirmação prévia da doença.

Após a confirmação do diagnóstico, por pesquisa direta e/ou cultura de amastigotas, 101 pacientes tiveram os prontuários analisados no ato da internação e após 36 meses e os pacientes que apresentavam registros satisfatórios, avaliando desde os aspectos clínicos iniciais até a alta ou desfecho final, tiveram a IL-6 e CRP quantificados em plasma.

Todos os pacientes elegíveis ao estudo preencheram os critérios acima definidos e foram escolhidos de forma sequencial.

O grupo controle foi composto por 10 pacientes, considerados saudáveis não foram submetidos a avaliação clínica.

Oito pacientes com diagnóstico de sepse, sem evidencia de LV, controle para outra patologia, oriundos da Unidade de Tratamento Intensivo (UTI) do IDTNP participaram do

estudo e tiveram as amostras de plasma quantificadas, para critérios de avaliação do teste rápido.

#### **4.2.8 Considerações éticas**

Este projeto foi aprovado pelo comitê de Ética e pesquisa da Universidade Federal do Piauí - CAE: 44037015.3.0000.5314, cuja vigência deu início em 14 de abril de 2015 (Anexo 1).

O estudo foi conduzido em conformidade com os preceitos fundamentais da Resolução do Conselho Nacional de Saúde-CNS 466/12 que trata das Diretrizes e Normas de Pesquisas Envolvendo Seres Humanos (BRASIL, 2012) e demais resoluções complementares a mesma. Análise Ética de Projetos de Pesquisa que Envolve Armazenamento de Material Biológico Humano ou Uso de Materiais Armazenados em Pesquisas Anteriores, CNS nº 441/2011, (CONEP, 2017). As Recomendações Éticas Internacionais para Pesquisas Biomédicas Envolvendo Sujeitos Humanos (WORLD, 1993) e das recomendações para o tratamento da LV no Brasil (BRASIL, 2016). Todos os pacientes incluídos no estudo, ou seus responsáveis, assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido, (Anexo 6).

Os voluntários participantes no estudo foram submetidos a riscos considerados pequenos e uma vez que as intervenções necessárias, como a coleta de sangue periférico, faz parte da rotina diagnóstica do IDTNP.

#### **4.2.9 Mensuração da exposição**

##### **4.2.9.1 Obtenção da amostra**

A obtenção da amostra foi realizada seguindo o protocolo previamente estabelecido para diagnóstico clínico e laboratorial dos pacientes com suspeita de LV, do IDTNP, sem alteração para este projeto. Para análise da IL-6 e CRP foi coletado sangue periférico para obtenção de plasma e os mesmos foram armazenados à - 80 °C, até a sua utilização.

##### **4.2.9.2 Sangue periférico e plasma**

As amostras de sangue periférico foram coletadas em tubos contendo ácido etileno-diamino tetra-acético (EDTA) (4,0 mL) e submetidos à centrifugação a 20.000 gramas (*g*) ou

14.000 rotações por minuto (rpm) por 10 minutos para separação das partes, foram fracionadas e armazenados em tubos *eppendorfs* de 1,5 mL à - 20 °C, até a sua utilização.

O plasma foi obtido a partir de sangue periférico. A coleta foi realizada em tubos com citrato (4,0 mL), submetidos à centrifugação a 20.000 gramas (*g*) ou 14.000 rotações por minuto (rpm) por 10 minutos para separação das partes. O sobrenadante foi retirado e colocado em tubos *Eppendorfs* de 1,5 mL e armazenados a - 20 °C.

#### **4.2.10 Mensuração do efeito**

##### **4.2.10.1 Citometria de fluxo (CBA) para IL-6**

###### **4.2.10.1.1 Padrão CBA-Flex**

A montagem da curva padrão foi realizada em um tubo *Eppendorf*, onde foi diluído a citocina liofilizada em 200,0 µL de diluente. Após 15 minutos em temperatura ambiente, foram feitas alíquotas de 25,0 µL para criopreservação a - 70 °C. Para diluição do padrão *Top Standard* (TS), utilizou-se um tubo *Eppendorf* com 90,0 µL de diluente *Assay Diluente* (AS), o qual adicionou-se 10,0 µL do padrão previamente diluído. Em tubos *eppendorf* com 50,0 µL de AS, realizou-se a diluição seriada (1:2 – 1:4 – 1:8 – 1:16 – 1:32 – 1:64 – 1:128 – 1:256). A solução inicial TS foi homogeneizada e 50,0 µL foram transferidos para os tubos subsequentes. O último tubo, identificado com branco, recebeu apenas os 50,0 µL de diluente AS.

###### **4.2.10.1.2 Solução com “beads” de captura CBA-Flex**

O preparo das *beads* se deu em tubo *Eppendorf*, onde foram adicionados 500,0 µL do tampão *Wash Buffer* (WB) em (Nº amostras / 2) sendo o volume da citocina a ser dosada. Nosso composto foi feito para 236 poços, sendo 226 amostras e 10 padrões. Assim foi adicionado um volume de 118,0 µL da citocina que resultou um volume final de 618,0 µL. A mistura dos reagentes foi centrifugado por 5 minutos a 14.000 rpm e 4 °C. Após a centrifugação foi retirado sobrenadante com uma seringa de 20,0 mL e agulha 40 X 12. O precipitado foi ressuscitado no diluente das esferas “*beads*” de captura. O cálculo do volume utilizado foi 18,0 µL para cada poço, sendo 4.248,0 µL. Manter as placas a 4 °C.

#### 4.2.10.1.3 Adição da fluorescência - PE CBA-Flex

O volume a ser adicionado, seguiu o cálculo do ( $N^{\circ}$  amostras / 2) de fluoróforos Ficoeritrina (PE) do inglês *Phycoerythrin*, ou seja, 118,0  $\mu$ L. O cálculo do diluente será ( $N^{\circ}$  x 17,5  $\mu$ L), ou seja, 2.065,0  $\mu$ L. Após o preparo, foi realizado vortex das “beads” e PE. Estes passos foram realizados brevemente e protegidos de luz.

#### 4.2.10.1.4 Ensaio CBA-Flex

Para realização do ensaio foram adicionados 17,0  $\mu$ L de PE e 18,0  $\mu$ L de “beads” aos 25,0  $\mu$ L de amostra em cada poço. Realizou-se um vortex e realizou-se incubação por 3 horas a 4 °C, protegido de luminosidade. Após a incubação foi adicionado 400,0  $\mu$ L de tampão de lavagem e centrifugado por 5 minutos a 1.500 rpm a 4 °C. Ao final da centrifugação, foi descartado o sobrenadante e adicionado 150,0  $\mu$ L de tampão de lavagem.

#### 4.2.10.1.5 Aquisição das amostras no citômetro de fluxo

Foram adquiridos 30.000 eventos por amostra no programa BD FACSDIVA<sup>®</sup>, presente no citômetro de fluxo FACSCANTOII.

As beads foram visualizadas de acordo com a intensidade de fluorescência. No CBA, as beads de captura das citocinas são misturadas com o anticorpo de detecção conjugado com o fluorocromo.

Os dados foram apresentados sob a forma de histogramas, que combinaram os parâmetros de número de partículas avaliadas ou de diagramas biparamétricos – dot-plot, que combinaram os parâmetros dois a dois. No dot-plot, cada ponto (dot) correspondeu a um evento analisado pelo citômetro representado pela intensidade média de fluorescência.

A conversão dos valores de intensidade média de fluorescência em concentração se deu no programa *Infinicity*<sup>®</sup> (citognos).

#### 4.2.10.2 Quantificação da Proteína C-reativa

A medida quantitativa da proteína C reativa foi realizada pelo método de química seca (Slides CRV VITROS Chemistry products – Ortho Clinical Diagnosis – *Johnson & Johnson*, Brasil), onde 11,0  $\mu$ L de plasma foram adicionados ao Slide CRP VITROS, cuja composição

são múltiplas camadas, formadas por elementos analíticos revestido por um suporte de poliéster. O formato imuno-cinético da CRP baseia-se num formato de imunoensaio enzimático heterogéneo em sanduíche. Este formato, um derivado da fosforilcolina é ligado de forma covalente às microesferas de polímero de poliestireno e, na presença de cálcio, atua como um agente de captura. O anticorpo monoclonal anti-CRP conjugado com peroxidase de rábano (HRP) atua como gerador de sinal. A densidade de reflexo do corante foi medida depois da adição do Fluido de Imuno-Lavagem VITROS. Após a adição do corante de detecção e incubação as amostras foram lavadas e as leituras realizadas em espectrofotômetro 5600 Ortho Clinical (Ortho Clinical Diagnosis – *Johnson & Johnson*, Brasil) a um comprimento de onda de 540 nm imediatamente depois da incubação.

#### **4.2.10.3 Análise de dados gerados**

##### **4.2.10.3.1 Análise estatística**

Os dados coletados foram armazenados em planilhas do programa Microsoft Windows Excell®, 2015. Os dados quantitativos foram apresentados em valores absolutos, medianas, médias desvio-padrão, desvio de erro e porcentagens.

A normalidade de distribuição de variáveis numéricas foi avaliada pelas medidas de Curtose. A normalização dos dados foi realizada utilizando logaritmo natural (Ln) quando necessários.

As diferenças entre variáveis dicotômicas foram analisadas pelo teste do quiquadrado ( $X^2$ ). A análise de correlação de Spearman foi empregada para detectar concordância entre variáveis contínuas com dados esparsos e a análise de correlação de Pearson foi empregada para variáveis com distribuição normal. O teste  $t$  de Student foi usado para comparar diferenças entre médias de variáveis contínuas de amostras independentes com distribuição normal. Os testes de Wilcoxon e Kruskal-Wallis foram usados para comparar diferenças entre médias de variáveis com distribuição não paramétrica.

A análise univariada simples foi utilizada para prever as variáveis que estavam associadas ao óbito. A regressão logística múltipla foi utilizada para mostrar o melhor modelo de inferência dos parâmetros.

Para validação da tecnologia utilizou-se a regressão linear simples para avaliar a correlação entre os teste. A acurácia do teste foi avaliada através dos valores preditivos positivos e negativos e o modelo foi caracterizado pela construção da curva ROC.

A concordância entre os testes foi avaliada pelo índice de Kappa e, para a interpretação deste índice, foram utilizados os critérios de Landis & Koch, 1977, (LANDIS; KOCH, 1977) como mostrado na tabela abaixo.

**Tabela 1.** Interpretação da escala de referência do índice Kappa.

Índice de Kappa	Grau de concordância
< 0,00	POBRE
0,00 –0,20	MUITO LEVE
0,21 –0,40	LEVE
0,41 –0,60	MODERADO
0,61 –0,80	SUBSTANCIAL
0,81 –1,00	QUASE PERFEITO

Fonte. LANDIS; KOCH, 1977

Em todos os testes foram considerados significantes o nível de rejeição da hipótese menor que 0,05 ou 5%.

Para a realização destas análises e construção de gráficos foi utilizado o programa BioEstat 5.3.

#### 4.2.10.3.2 Análise da probabilidade de morte

Utilizou-se o teste *Kala-Cal*®, programa que permite calcular a probabilidade de morte dos pacientes com LV, desenvolvido no laboratório de pesquisas em Leishmanioses IDTNP/UFPI, cujo endereço eletrônico para o acesso é <http://sbmt.org.br/kalacal/> (COSTA et al., 2016).

#### 4.2.10.3.3 Análise da intensidade de cor da curva padrão IL-6

O ImageJ é um *software* para processamento e análise de imagens, desenvolvido por Wayne Rasband no National Institute of Mental Health, USA, em linguagem Java. Com este *software* é possível exibir, editar, analisar, processar, salvar e imprimir imagens de 8, 16 e 32 bits. O programa permite o processamento de diversos formatos de imagem como TIFF, GIF,

JPEG, BMP, DICOM e FITS. No ImageJ, o cálculo das áreas é feito pela contagem de pixels das regiões selecionadas pelo usuário ou por um algoritmo específico (RASBAND, 2011). O ImageJ atua na imagem pela intensidade, ou nível de cinza dos pixels. As imagens transformadas em escala de cinza, tiveram 100 medidas de área quantificadas e avaliadas quanto a intensidade da tonalização.

#### 4.2.10.3.4 Análise das propriedades das AuNPs utilizadas no teste rápido

Utilizando o *software* ImageJ, as imagens das nanopartículas do desenho originado, foram transformadas para 8 bits (níveis de cinza entre 0 - 255, necessário para o cálculo da transformação watershed) para obtenção da imagem binária. Como a imagem original possui uma barra de escala, através de uma ferramenta do próprio *software*, foi realizada a medida deste comprimento em pixels e sua conversão, que neste caso foi para 50,0 nm. Em função de diversas características da imagem analisada, como diferenças de tonalidades dos níveis de cinza, os objetos foram agrupados e os ruídos provocados pelas técnicas de processamento utilizadas foram corrigidos através da delimitação dos contornos das nanopartículas. Estes procedimentos foram feitos sempre tendo como base a imagem original. Tal alternativa pode ser realizada sem comprometimento da qualidade da análise, desde que os contornos originais fossem realçados. (DIAS, 2008). Os valores gerados das imagens foram processadas quanto as classes de medida das áreas das partículas, a frequência simples absoluta, frequência simples relativa, a frequência absoluta acumulada e a frequência relativa acumulada das partículas medidas. Com estes dados foi possível a obtenção de tabelas e gráficos.

### 4.3 Controle de qualidade e validação do teste LFA (IL-6)

O processo de controle de qualidade e validação do teste LFA considerou primeiramente os parâmetros de fluxo e tempo de corrida na tira de teste. Desta forma, avaliou-se:

**Fluxo:** a área de leitura dos testes deveriam estar limpa após 20 minutos. Foi tolerado um fundo rosa claro desde que a linha do controle estivesse claramente legível, e um fundo amarelado quando as amostras de plasma apresentavam coloração e viscosidade alteradas.

**Tempo:** o tempo de fluxo, ou seja, tempo que a amostra/conjugado levaram para atingir a janela de leitura, o qual não deveria ser superior a 5 minutos.

As etapas do controle de qualidade foram contempladas ainda avaliando os controles negativos e positivos, onde, diferentes concentrações de Tween 20<sup>®</sup> na presença/ausência de proteína recombinante IL-6 e com a proteína em diferentes concentrações foram testados.

Cada etapa de desenvolvimento do teste passou por um controle de qualidade, que serviu para a validação, para os quais foram definidos os seguintes requisitos (BÜHRER-SÉKULA et al., 2003; CLEOPHAS; DROOGENDIJK; VAN OUWERKERK, 2008).

Acurácia ou precisão do teste é a validação do sistema ou a habilidade do teste dizer se o positivo e de fato positivo e o negativo, verdadeiro negativo, indicados por especificidade e sensibilidade.

**Especificidade:** as tiras devem apresentar resultados negativos em 100% das amostras que apresentarem apenas tampão PBS independente das concentrações de Tween 20<sup>®</sup>. Amostras de plasma com baixas concentrações de IL-6 devem ser rigorosamente avaliadas quanto a presença de marcação.

**Sensibilidade:** os testes devem apresentar os resultados designados a cada amostra testada. As tiras de teste com variadas concentrações de proteína recombinante foram testadas em duplicata e pelo menos em duas as marcações devem estar presentes e homogênea.

Sabendo que IL-6 é mensurado quantitativamente, para validação do teste LFA foi necessário considerar um padrão ouro de mensuração, no caso, a medida realizada por citometria de fluxo (variável dependente) e o novo teste a variável independente. A exatidão e validação do teste foi dada por uma regressão linear positiva entre os teste.

**Reprodutibilidade:** refere-se a repetição entre as diferenças das duplicatas. Por tanto, avaliou-se:

1. Desvio padrão;
2. Coeficiente de repetitividade;
3. Correlação intra-classes.

**Seletividade:** refere-se a capacidade do teste para detecção de IL-6 não reconhecer outras proteínas.

**Precisão:** a boa precisão refere-se a variação ou distanciamento em que o valor indicado tem do alvo, ou seja, padrão. A precisão foi medida pelo desvio padrão (SD) e desvio de erro (SE).

**Continuous receiver operating curve (ROC):** a curva ROC indica a precisão e acurácia do teste diagnóstico através da aproximação da curva ROC ao eixo y.

#### 4.4 Softwares para dispositivos móveis

O desenvolvimento do App para dispositivos móveis vem sendo realizado através de uma parceria com FACTOS – *Factory of Computational Solutions*, vinculada ao laboratório de computação da UFPI, cuja denominação fictícia é “Detecção Colorimétrica”.

Foi criado o protótipo de um *software* para dispositivos móveis, com a finalidade de capturar, interpretar e quantificar o sinal colorimétrico baseado nas concentrações de IL-6 pura e transformação da intensidade de cor, gerou um algoritmo numérico. O aplicativo foi desenvolvido na plataforma IDE *Android Studio* e para implementação do App, utilizou-se o *Android nativo* e o pacote *Opencv*, que disponibiliza funções de visão computacional e processamento de imagens para auxiliar no trabalho com as cores.

Para funcionamento do App foi escolhido o espaço de cor CIE L\*a\*b para representar a cor, onde nessa representação foi levado em consideração a luminosidade (**L**), as coordenadas vermelho/verde (**a**) e as coordenada amarelo/azul (**b**). Utilizando essas informações foram quantificados as diferenças entre as duas cores utilizando a seguinte formula:

$$\Delta E^* = [\Delta L^2 + \Delta a^2 + \Delta b^2]^{1/2}$$

$\Delta E$  representa a diferença entre as duas cores,  $\Delta L$  a diferença das taxas de luminosidade das duas cores,  $\Delta a$  a diferença das taxas das coordenadas do vermelho/verde e  $\Delta b$  a diferença das taxas das coordenadas do amarelo/azul. Baseado no valor do  $\Delta E$  a cor da amostra foi classificada, de acordo com a proximidade desse valor, para cada taxa do padrão.

## 5 RESULTADOS

### Seção I

#### 5.1 Interleucina 6 na doença grave

##### 5.1.1 Caracterização do grupo de estudo para LV

O estudo foi composto por cento e um pacientes com diagnóstico de LV, confirmados através de pesquisa direta e cultura de amastigotas.

A presença de parasitos em extensão de medula óssea avaliada microscopicamente foi positiva em 84 (83,1%) dos participantes e 74 (73,2%) tiveram o diagnóstico confirmado em cultura.

O estudo foi composto por 13 (12,8%) pacientes com idade inferior a 1 ano, 23 (22,7%) com idades entre 2 e 18 anos, 35 (34,6%) com idades entre 19 e 39 anos e 30 (29,7%) pacientes com mais de 40 anos. A média de idade dos pacientes estudados foi de 27,46 (SD 20,27) anos. Cinquenta e nove pacientes (58,4%) eram do sexo masculino (Tabela 2).

Oito pacientes (7,9%) foram ao óbito e 35 (34,5%) dos pacientes tinham coinfeção HIV-1/*Leishmania*.

As variáveis demográficas (idade e sexo) mostraram-se homogêneas entre os grupos estudados ( $p = 3022$ ;  $p = 0,5967$ ), respectivamente.

**Tabela 2.** Características dos pacientes com leishmaniose visceral que compõem o estudo.

	<b>Categoria</b>	<b>Nº. de pacientes</b>	<b>(%)</b>	<b>Valor de <i>p</i></b>
<b>Idade</b>	≤ 1 anos	13	12,8	0,3022
	2 - 18	23	22,7	
	19 – 39 anos	35	34,6	
	≥ 40 anos	30	29,7	
<b>Gênero</b>	Masculino	59	58,4	0,5967
	Feminino	42	41,5	
<b>HIV-1</b>		35	34,6	
<b>Óbito</b>		8	7,9	
<b>Total</b>		<b>101</b>	<b>100</b>	

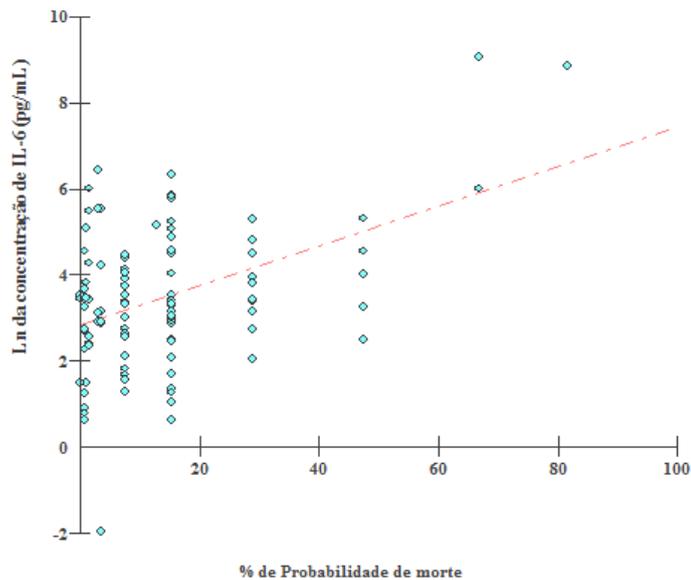
### 5.1.2 Probabilidade de morte

A probabilidade de morte (PM) média do grupo de estudo foi 13,7%. Homens apresentaram PM superior às mulheres (11,5% vs 7,6%;  $p = 0,0468$ ). Pacientes com idade inferior a 18 anos tiveram PM inferior ao pacientes com idade superior a 18 anos (1,3% vs 15,4%;  $p < 0,0001$ ).

Pacientes com PM inferior a 15,4% apresentaram níveis mais baixos de interleucina 6 (25,97 pg/mL vs 53,64 pg/mL;  $p = 0,0178$ ). Desta forma, considerou-se graves os sujeitos que apresentaram PM superior a 15,5%, uma vez que o mesmo é considerado indicador de gravidade para LV (SENE, 2013; COSTA et al., 2013; DOS SANTOS et al., 2016).

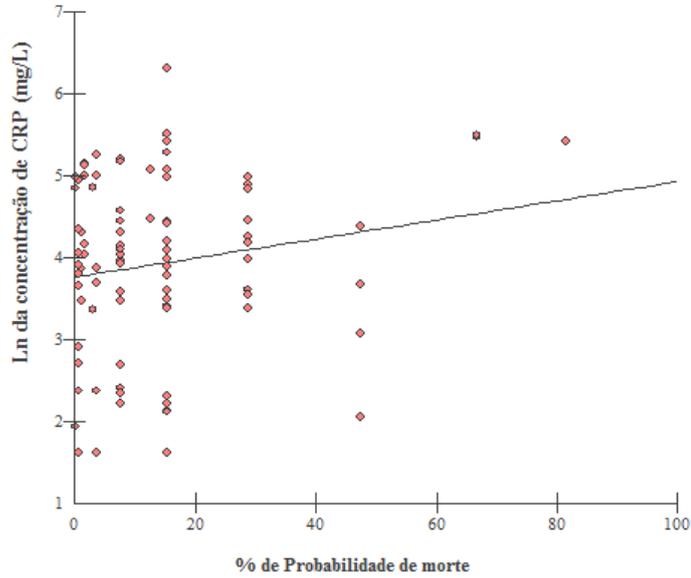
A PM apresentou-se moderadamente correlacionada com os níveis de IL-6 ( $r = 0,5550$ ;  $p < 0,0001$ ) e levemente correlacionada com a CRP ( $r = 0,2169$ ;  $p = 0,0367$ ), figuras 12 e 13.

**Figura 12:** Correlação positiva entre a concentração de interleucina 6 medida no plasma com o percentual de probabilidade de morte dos pacientes com leishmaniose visceral. Valor de  $p < 0,0001$ . Coeficiente de correlação de Pearson,  $r = 0,5550$ .



. Fonte: Autoria própria, 2018.

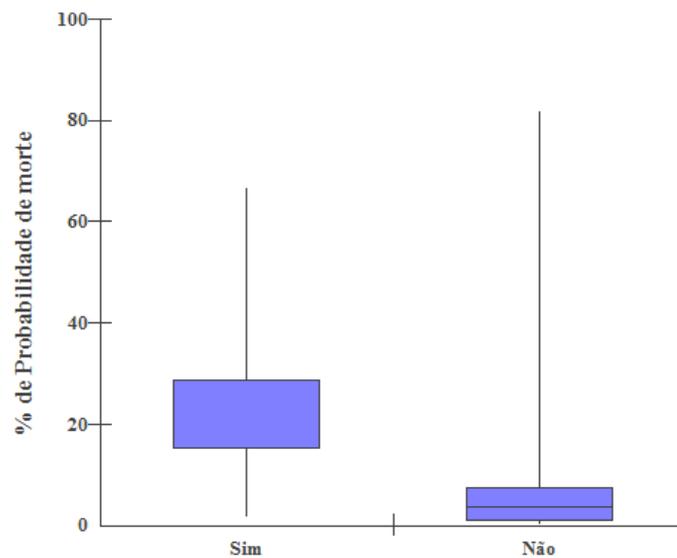
**Figura 13:** Correlação positiva entre a concentração de proteína C-reativa no plasma com o percentual de probabilidade de morte dos pacientes com leishmaniose visceral. Valor de  $p = 0,0367$ . Coeficiente de correlação de Pearson,  $r = 0,2169$ .



. Fonte: Autoria própria, 2018.

Pacientes com coinfeção HIV-1/*Leishmania* apresentaram PM superior aos pacientes não coinfectados (PM: 15,4% vs 3,6%;  $p < 0,0001$ ), figura 14.

**Figura 14:** Associação entre o percentual de probabilidade de morte dos pacientes com leishmaniose visceral na presença e ausência de coinfeção HIV-1/*Leishmania*. Valor de  $p < 0,0001$ .



. Fonte: Autoria própria, 2018.

### 5.1.3 Interleucina 6

Após a leitura dos níveis de citocinas em intensidade média de fluorescência, os valores foram convertidos em pg/mL. Todas as amostras mensuradas tiveram níveis de IL-6 detectadas. O nível mínimo de detecção foi 0,13 pg/mL de sangue.

Os níveis normais de IL-6 no plasma são inferiores a 5,0 pg/mL de sangue (HUNTER; JONES, 2015). A concentração média de IL-6 no grupo estudado foi 232,80 pg/mL e a mediana 29,25 pg/mL. Para fins estatísticos, considerou-se a mediana dos valores.

A caracterização clínica dos pacientes com LV e sua associação com os níveis de IL-6 estão descritos na tabela 3.

As variáveis demográficas (idade e sexo) não estão associadas ao aumentos dos níveis de IL-6 ( $p = 0,1928$ ;  $p = 0,3242$ ) respectivamente.

Variados parâmetros clínicos presentes nos pacientes com LV (febre, fadiga, perda de peso, presença de petéquias, vomito, epistaxe e icterícia) mostraram-se associados ao aumento dos níveis de IL-6, embora não estatisticamente significantes.

Na presença de sepse os pacientes apresentaram elevados níveis para IL-6, (301,40 vs 28,12;  $p = 0,0127$ ).

Pacientes que foram a óbito apresentaram níveis de IL-6 mais elevados (195,9 pg/mL vs 26,7 pg/mL;  $p = 0,0007$ ). A gravidade da LV normalmente é caracterizada por sangramentos e hemorragia. Neste grupo de pacientes, foram verificados elevados níveis da citocina (403,5 pg/mL vs 26,4 pg/mL;  $p < 0,0001$ ).

A coinfeção HIV-1/*Leishmania* mostrou estar relacionada a elevados níveis de interleucina 6 (88,07 pg/mL vs 19,14 pg/mL;  $p = 0,0085$ ).

**Tabela 3.** Associações entre as variáveis clínicas e os níveis de IL-6 (pg/mL) no plasma de pacientes com LV.

	Característica clínica		Valor de <i>p</i>
	Presente (mediana)	Ausente (mediana)	
<b>HIV-1</b>	88,07	19,14	0,0085
<b>Óbito</b>	195,98	26,78	0,0007
<b>Hemorragia</b>	401,23	26,04	< 0,0001
<b>Sepse</b>	301,40	28,12	0,0126*
<b>Febre</b>	33,75	12,11	0,0626
<b>Perda de peso</b>	34,00	29,95	0,2550
<b>Fadiga</b>	62,52	32,90	0,2615
<b>Falta de ar</b>	29,90	28,12	0,8328
<b>Dispneia</b>	48,83	27,53	0,1685
<b>Pulmão nl</b>	32,97	30,83	0,5132
<b>Vômito</b>	33,72	30,50	0,5496
<b>Diarreia</b>	27,51	31,76	1,00
<b>Esplenomegalia</b>	28,53	29,17	0,9910
<b>Hepatoesplenomegalia</b>	30,83	35,27	0,3530
<b>Edema</b>	26,11	23,18	0,9287
<b>Icterícia</b>	42,37	30,17	0,5526
<b>Oligúria</b>	15,43	29,61	0,3248
<b>Petéquias</b>	29,42	23,61	0,4785
<b>Equimose</b>	32,07	28,69	0,9552
<b>Epistaxe</b>	105,97	31,14	0,1900
<b>Sangramento gengival</b>	29,86	27,22	0,7049
<b>Sangramento de venóclise</b>	38,54	29,25	0,6835

### 5.1.4 Proteína C-reativa

Após a leitura dos níveis de CRP, 94 amostras (93,06%), tiveram resultados satisfatórios e os valores foram apresentados em mg/L. Estudos consideram valores de CRP normais inferior a 10,0 mg/L de sangue para indivíduos saudáveis (RIDKER et al., 2003). O valor médio de CRP no grupo estudado foi de 83,67 mg/L. O nível mínimo de detecção na população estudada foi de 5,0 mg/L de sangue e o máximo, 550,0 mg/L de sangue. Sete amostras tiveram volume de plasma insatisfatório para confirmação dos resultados na contraprova.

As variáveis demográficas (idade e sexo) não estão associadas os níveis de proteína C-reativa ( $p = 0,9280$ ;  $p = 0,2041$ ) respectivamente.

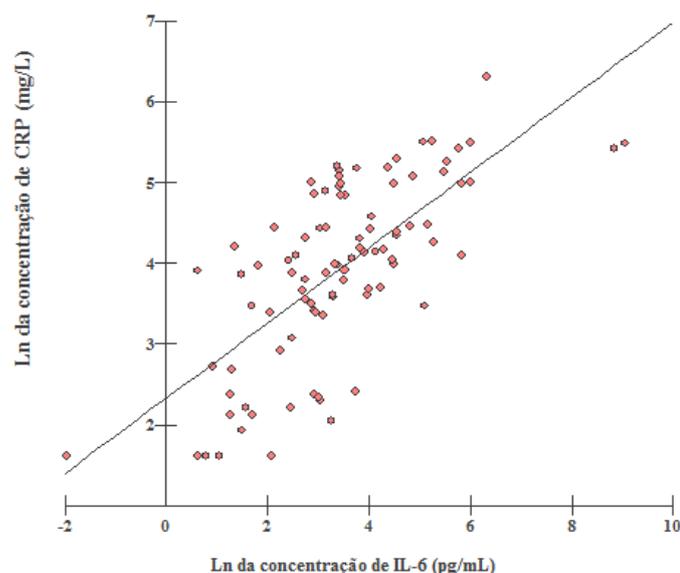
As associações clínicas com os níveis de CRP estão reportados na tabela 4.

Na presença de sepse os pacientes apresentaram níveis elevados de CRP (186,15 vs 56,40;  $p = 0,0160$ ).

Sabendo que níveis elevados de CRP estão associados a infecções e inflamações, não diferente, evidenciamos níveis elevados de CRP nos pacientes que sangraram (226,65 vs 53,30;  $p < 0,0001$ ) e tiveram o desfecho fatal (240,40 vs 53,70;  $p = 0,0033$ ).

Os níveis de IL-6 aumentam significativamente com o aumento dos níveis de CRP ( $r = 0,6997$ ;  $p < 0,0001$ ), figura 15, e correlacionaram-se substancialmente.

**Figura 15.** Correlação entre a concentração de interleucina 6 com a proteína C-reativa no plasma de pacientes com leishmaniose visceral. Valor de  $p < 0,0001$ . Coeficiente de correlação de Pearson,  $r = 0,6997$ .



. Fonte: Autoria própria, 2018.

**Tabela 4.** Associações entre as variáveis clínicas e os níveis de CRP(mg/mL) no plasma de pacientes com LV.

	Característica clínica		Valor de <i>p</i>
	Presente (mediana)	Ausente (mediana)	
<b>HIV-1</b>	60,50	46,45	0,1379
<b>Óbito</b>	240,40	53,70	0,0033
<b>Hemorragia</b>	226,65	53,30	< 0,0001
<b>Sepse</b>	186,15	56,40	0,0160
<b>Febre</b>	60,30	48,70	0,3407
<b>Perda de peso</b>	50,40	63,60	0,3725
<b>Fadiga</b>	53,10	80,30	0,2582
<b>Falta de ar</b>	45,15	57,80	0,8227
<b>Dispneia</b>	93,70	57,10	0,2671
<b>Pulmão nl</b>	56,40	63,00	0,4042
<b>Vômito</b>	46,40	60,30	0,2784
<b>Diarreia</b>	49,35	60,10	0,1438
<b>Esplenomegalia</b>	53,10	80,30	0,3742
<b>Hepatoesplenomegalia</b>	57,80	55,45	0,6501
<b>Edema</b>	66,10	30,20	0,6506
<b>Icterícia</b>	55,10	57,80	0,7494
<b>Oligúria</b>	60,10	35,90	0,2079
<b>Petéquias</b>	65,50	56,75	0,7265
<b>Equimose</b>	46,60	57,40	0,6941
<b>Epistaxe</b>	57,45	44,60	0,5852
<b>Sangramento gengival</b>	57,80	44,05	0,5445
<b>Sangramento de venóclise</b>	40,50	57,80	0,5408

### 5.1.5 Caracterização do grupo controle saudáveis

Voluntários participantes do grupo controle eram do sexo feminino com idade média 30,6 ( $\pm$  9,5) anos.

### 5.1.6 Caracterização do grupo com sepse

A média de idade dos participantes sépticos em UTI, foi de 36,7 ( $\pm$  9,9) anos, sendo 7 (87,5%) do sexo masculino e apresentaram níveis de IL-6 médio de 49,8 pg/mL ( $\pm$  31,67) e o aumento dos níveis desta interleucina mostraram-se levemente correlacionados com oligúria ( $p = 0,0343$ ), icterícia ( $p = 0,0521$ ), hemorragia ( $p = 0,0437$ ) e albuminemia ( $p = 0,0478$ ).

Todos os pacientes eram portadores de HIV-1.

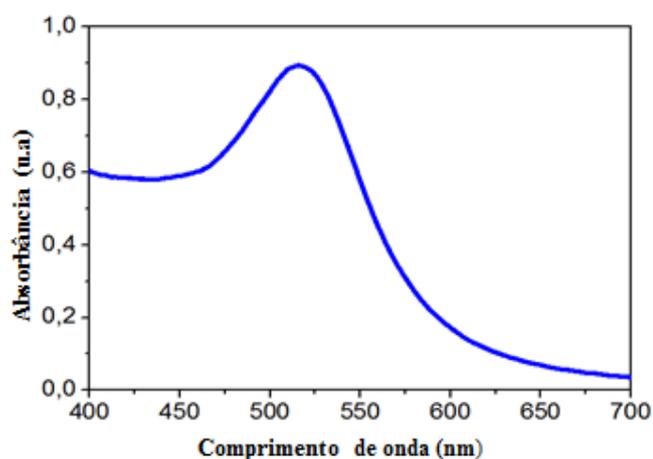
## Seção II

### 5.2 Caracterização do teste LFA – *Quick-IL test (IL-6)*

#### 5.2.1 Caracterização de nanopartículas de ouro

A caracterização das AuNPs relevou-se reprodutível, na medida em que todas as soluções de AuNPs apresentam uma banda de ressonância plasmonica de superfície localizada (LSPR) característica situada a aproximadamente 520 nm, como se pode observar na Figura 16, evidenciando a formação de suspensão bem dispersa.

**Figura 16.** Espectro de UV-Visível de AuNPs com  $\approx 14$  nm de diâmetro a uma concentração de 5,70 nM. A banda LSPR encontra-se situada a 520 nm.

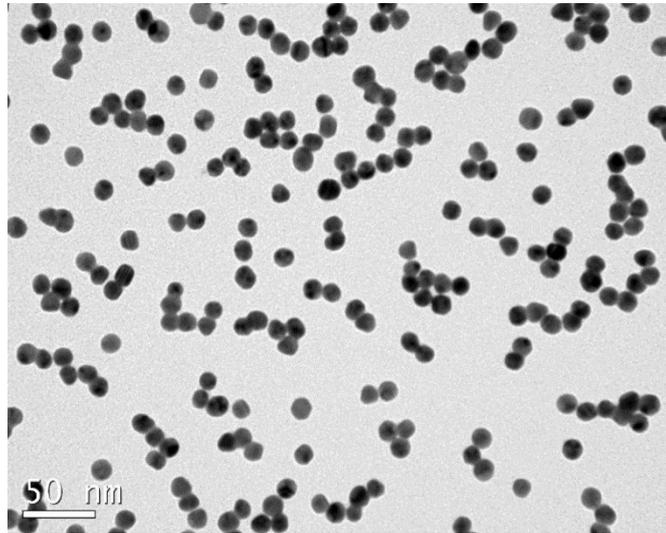


Fonte: Autoria própria, 2018

A partir das imagens TEM foi possível observar a homogeneidade do tamanho e a forma das AuNPs. A figura 17 mostra uma imagem realizada no TEM, com uma escala de 50 nm inserida. Observa-se que a amostra é composta por nanopartículas esféricas com uniformidade de forma e tamanho.

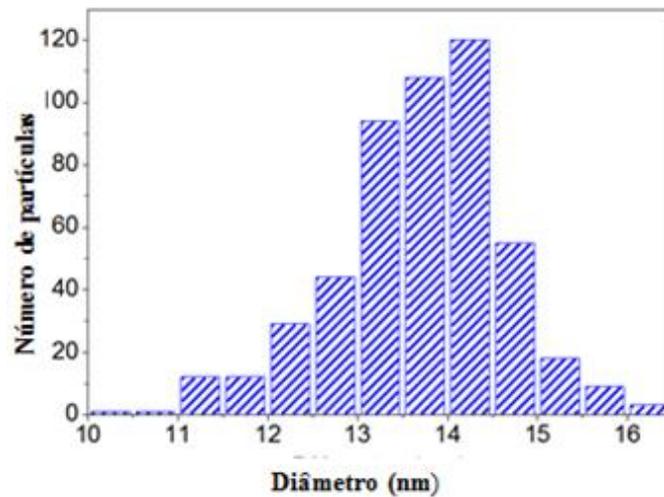
Utilizando os recursos do *software* ImageJ, 500 nanopartículas foram contadas e o tamanho médio estimado foi de 14 nm, como pode ser observado pelo histograma representado na figura 18.

**Figura 17.** Micrografia TEM com escala de 50 nm, caracterizando a homogeneidade de forma e tamanho das nanopartículas de ouro.



Fonte: Autoria própria, 2018

**Figura 18.** Histograma da distribuição de diâmetro médio das partículas de ouro, evidenciando o predomínio de partículas de aproximadamente 14 nm, utilizando programa ImageJ.



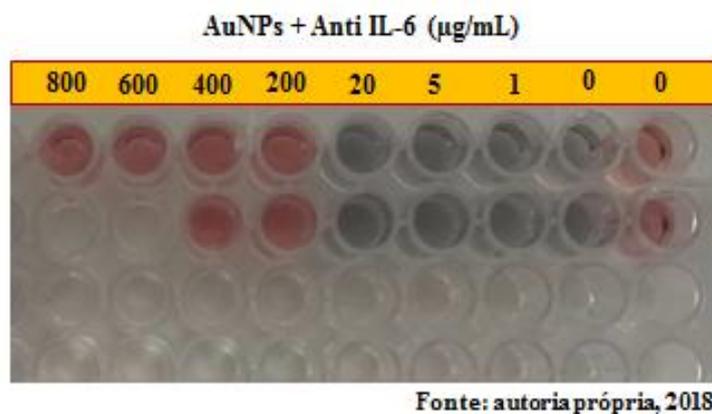
Fonte: Autoria própria, 2018

### 5.2.2. Teste de agregação das AuNPs no conjugado

O teste de agregação das AuNPs/Anti-IL-6 mostrou-se satisfatório para as concentrações de 200,0 a 800,0  $\mu\text{g/mL}$  como evidenciado na figura 19.

A coloração rosa, mostra a conjugação satisfatória (formação do conjugado) de AuNPs/Anti-IL-6 e a coloração cinzenta, para as concentrações de 20,0  $\mu\text{g/mL}$ , 5,0  $\mu\text{g/mL}$ , 1,0  $\mu\text{g/mL}$  e 0, na presença de NaCl a 10%, caracteriza a agregação.

**Figura 19.** Teste de agregação de AuNPs nas concentrações de 800,0  $\mu\text{g/mL}$ ; 600,0  $\mu\text{g/mL}$ ; 400,0  $\mu\text{g/mL}$ ; 200,0  $\mu\text{g/mL}$ ; 20,0  $\mu\text{g/mL}$ ; 5,0  $\mu\text{g/mL}$ ; 1,0  $\mu\text{g/mL}$  e 0  $\mu\text{g/mL}$  de Anti-IL-6, na presença e na ausência de cloreto de sódio a 10%.

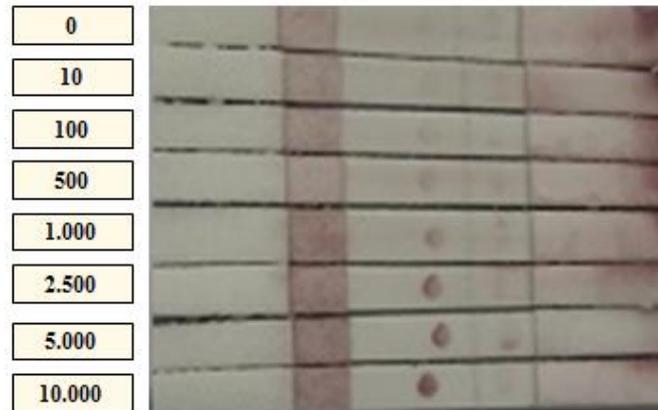


### 5.2.3. Interpretação da curva padrão para IL-6 recombinante

Considerou-se as curvas padrões nas concentrações (400,0  $\mu\text{g/mL}$ ; 600,0  $\mu\text{g/mL}$  e 800,0  $\mu\text{g/mL}$ ) de anti-IL-6 no conjugado, uma vez que foram quantificadas amostras reais nestas condições. A curva padrão referenciada foi a de 800,0  $\mu\text{g/mL}$ , com maior número de amostras quantificadas.

As diluições seriadas utilizadas para construção da curva padrão com a proteína IL-6 recombinante, seguiu um padrão de intensidade de cor linear e progressivo, ou seja, de acordo com as diluições, houve uma aumento progressivo intensidade de cor, como evidencias na figura 20.

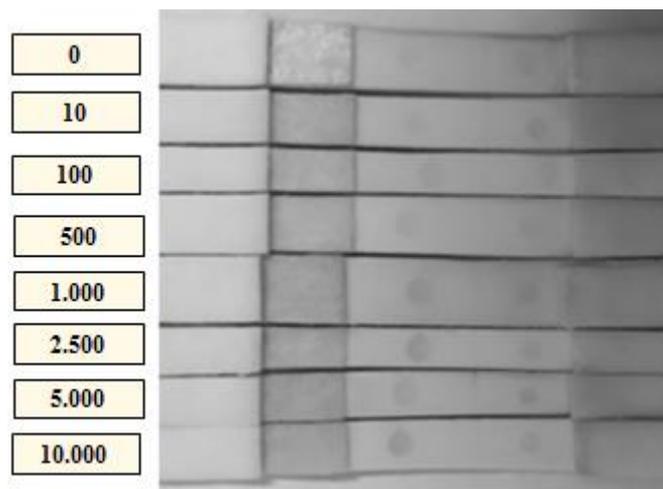
**Figura 20.** Curva padrão de IL-6 de acordo com a intensidade de cor, utilizando tiras do teste rápido LFA, para as concentrações de 0 ng/mL; 10 ng/mL, 100 ng/mL, 500 ng/mL, 1.000 ng/mL, 2.500 ng/mL; 5.000 ng/mL e 10.000 ng/mL de interleucina 6 recombinante



Fonte: Aatoria própria, 2018

Utilizando um editor e quantificador de imagem ImageJ, que atua na imagem pela intensidade ou nível de cinza dos pixels, realizamos a transformação das cores para a escala cinza, Figura 21, onde as medidas geradas foram transformadas em valores médios, correspondente a quantidade de proteína IL-6 depositada na fita como demonstrado na tabela 5.

**Figura 21.** Imagem das tiras de curva padrão transformada para a escala de cinza, nas concentrações de 0 ng/mL; 10 ng/mL, 100 ng/mL, 500 ng/mL, 1.000 ng/mL, 2.500 ng/mL; 5.000 ng/mL e 10.000 ng/mL de interleucina 6 recombinante, para leitura dos pixels nas áreas de teste e controle para quantificação pelo programa ImageJ.



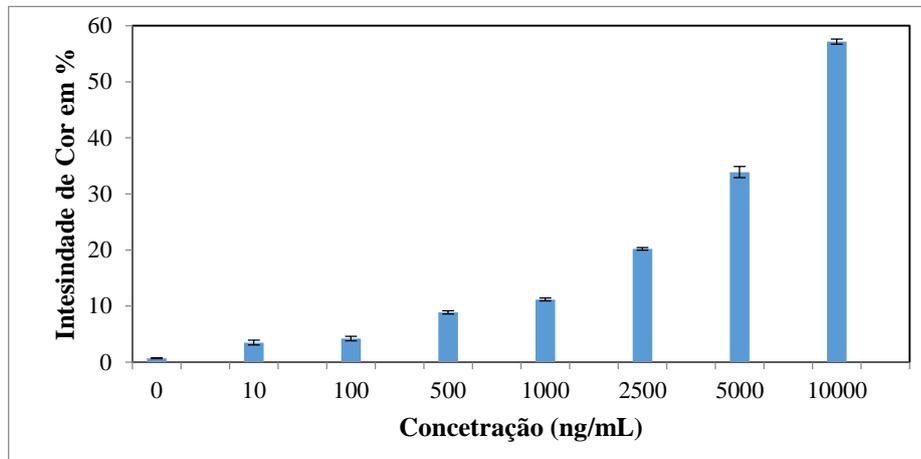
Fonte: Aatoria própria, 2018

**Tabela 5** – Distribuição da área em nm<sup>2</sup> correspondente aos pixels contados de acordo com a coloração das imagens.

Concentração de IL-6 (ng/mL)	Área	Pixels 100-x 133,500	Média	SD																																														
0	132.739	0.761	0.690	0.100																																														
	132.881	0.619			10	129.722	3.778	3.480	0.422	130.318	3.182	100	128.989	4.511	4.227	0.402	129.557	3.943	500	124.443	9.057	8.858	0.281	124.841	8.659	1.000	122.165	11.335	11.153	0.257	122.529	10.972	2.500	113.142	20.358	20.190	0.237	113.477	20.023	5.000	98.892	34.608	33.892	1.012	100.324	33.176	10.000	76.028	57.472	57.159
10	129.722	3.778	3.480	0.422																																														
	130.318	3.182			100	128.989	4.511	4.227	0.402	129.557	3.943	500	124.443	9.057	8.858	0.281	124.841	8.659	1.000	122.165	11.335	11.153	0.257	122.529	10.972	2.500	113.142	20.358	20.190	0.237	113.477	20.023	5.000	98.892	34.608	33.892	1.012	100.324	33.176	10.000	76.028	57.472	57.159	0.442	76.654	56.847				
100	128.989	4.511	4.227	0.402																																														
	129.557	3.943			500	124.443	9.057	8.858	0.281	124.841	8.659	1.000	122.165	11.335	11.153	0.257	122.529	10.972	2.500	113.142	20.358	20.190	0.237	113.477	20.023	5.000	98.892	34.608	33.892	1.012	100.324	33.176	10.000	76.028	57.472	57.159	0.442	76.654	56.847											
500	124.443	9.057	8.858	0.281																																														
	124.841	8.659			1.000	122.165	11.335	11.153	0.257	122.529	10.972	2.500	113.142	20.358	20.190	0.237	113.477	20.023	5.000	98.892	34.608	33.892	1.012	100.324	33.176	10.000	76.028	57.472	57.159	0.442	76.654	56.847																		
1.000	122.165	11.335	11.153	0.257																																														
	122.529	10.972			2.500	113.142	20.358	20.190	0.237	113.477	20.023	5.000	98.892	34.608	33.892	1.012	100.324	33.176	10.000	76.028	57.472	57.159	0.442	76.654	56.847																									
2.500	113.142	20.358	20.190	0.237																																														
	113.477	20.023			5.000	98.892	34.608	33.892	1.012	100.324	33.176	10.000	76.028	57.472	57.159	0.442	76.654	56.847																																
5.000	98.892	34.608	33.892	1.012																																														
	100.324	33.176			10.000	76.028	57.472	57.159	0.442	76.654	56.847																																							
10.000	76.028	57.472	57.159	0.442																																														
	76.654	56.847																																																

A figura 22, representa o percentual de intensidade de cor para padronização da curva padrão pelo programa ImageJ. A marcação pontual com a concentração de 0 ng/mL de IL-6, apresentou uma intensidade média de cor de 0,6% a concentração de 10 ng/mL, uma intensidade média de cor de 3,4% a concentração de 100 ng/mL, uma intensidade média de cor de 4,2% a concentração de 500 ng/mL, uma intensidade média de cor de 8,85%, a concentração de 1.000 ng/mL, uma intensidade média de cor de 11,1% a concentração de 2.500 ng/mL, uma intensidade de 20,1%, para 5.000 ng/mL a intensidade de cor foi 33,8% e para 10.000 ng/mL, uma intensidade média de cor de 57,1%.

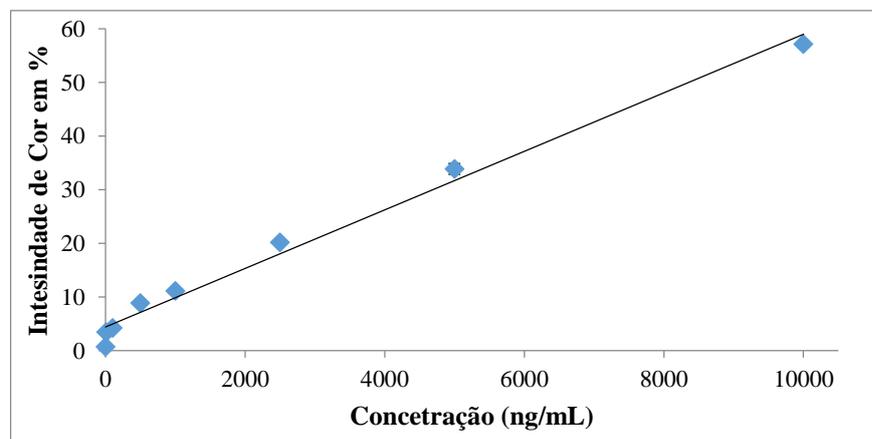
**Figura 22.** Distribuição da quantidade de pixels na área medida ( $\text{nm}^2$ ) pela intensidade de cor, de acordo com os ng/mL de IL-6.



Fonte: Autoria própria, 2018

O índice de inclinação da reta usada para estimar a eficiência da curva apresentou um coeficiente angular de  $0,005 \times 4,42$ . O coeficiente de correlação, que avalia a precisão da curva padrão, foi de 0,987, figura 23.

**Figura 23.** Representação gráfica linear da porcentagem de cor de acordo com a concentração de IL-6.



Fonte: Autoria própria, 2018

O limite de detecção (LD) foi calculado a partir da média do branco, acrescido de 3 X o valor do seu SD. Desta forma o LD do LFA, *Quick-IL test* (IL-6), estimado pelo ImageJ, foi de 0,72 ng/mL de IL-6.

A padronização da curva padrão em pg/mL não foi satisfatória linearmente para todos os pontos testados. Desta forma, buscamos verificar quais parâmetros poderiam influenciar na melhoria dos resultados. Foram testadas duas diferentes concentrações de Tween 20<sup>®</sup> no

tampão de corrida (0,05% e 0,1%) e no preparo da membrana receptora de amostra (0,05% e 0,1%). Assim, os melhores resultados obtidos foram com as tiras preparadas com 0,05% de Tween 20<sup>®</sup> para ambos os parâmetros. A tentativa de construção da curva não foi bem sucedida e houve marcação dos pontos de 10, 1.000 pg/mL e das concentrações mais elevadas com correspondentes valores as curvas em ng/mL.

### Seção III

#### 5.3. Caracterização dos grupos de estudo para validação do sensor LFA – *Quick-IL test* (IL-6)

O ensaio foi caracterizado por experimentos com amostras reais (pacientes com LV) em 3 momentos distintos e as quantificações foram realizadas para solução de conjugado AuNPs nas concentrações de 400,0; 600,0 e 800,0  $\mu\text{g/mL}$  de anticorpo anti-IL-6, Tabela 6.

Os testes preliminares não se mostraram satisfatórios para a montagem da curva padrão com a proteína IL-6 recombinante. Porém as amostras de plasma quantificadas nestes testes, para as concentrações de 400,0  $\mu\text{g/mL}$  e 600,0  $\mu\text{g/mL}$ , 22 (19,5%) apresentaram a marcação pontual em 50% das amostras, sendo 6 (27,2%) com marcação visual correspondente aos níveis de IL-6 medidos por citometria de fluxo, comparativo as curvas padrão montadas subsequentemente para a escala de cor.

Em um segundo momento, na tentativa de padronização da curva padrão, duas concentrações de anti-IL-6 foram testadas: 400,0 e 600,0  $\mu\text{g/mL}$ . O padrão mostrou-se satisfatório, apresentando intensidade de sinal crescente quando a concentração de anti-IL-6 no conjugado foi de 600,0  $\mu\text{g/mL}$ . Novas amostras biológicas foram testadas, 24 (21,4%) e 12 (50%) apresentaram sinal colorimétrico onde 11 (45,8%) estão visualmente pareados com a intensidade de cor pela curva padrão, na inspeção visual.

A maior intensidade de cor na linha de teste, foi obtida com as concentrações de 600,0 e 800,0  $\mu\text{g/mL}$  de anti-IL-6 na solução de preparo do conjugado com AuNPs. A comparação da intensidade de sinal para ambas as concentrações mostraram-se satisfatórias, porém as tiras preparadas com a concentração de 800,0  $\mu\text{g/mL}$  apresentou intensidade de sinal mais homogênea do que as realizadas com as concentrações anteriores. Sessenta e seis (58,9%) das amostras biológicas de pacientes com LV foram mensuradas com este novo padrão de conjugado e 60 amostras (90,9%) apresentaram sinal colorimétrico, sendo 46 (69,6 %) correspondentes visualmente com a intensidade de cor baseado na curva padrão.

Cento e trinta e seis quantificações foram realizadas com plasma humano, sendo 112 referentes aos pacientes com LV, onde 11 destas medidas foram de pacientes repetidos, cujas medidas foram realizadas com diferentes concentrações de Abs no conjugado.

O grupo de pacientes com sepse (8), quando testados para o sensor apresentaram marcação pontual para IL-6, porém não compatíveis com a intensidade de cor, baseados nas

medidas de citometria de fluxo e percentual de intensidade de cor da curva padrão. Estas amostras foram testadas em triplicata (24 testes).

**Tabela 6.** Caracterização das amostras de plasma dos pacientes com LV testadas para as concentrações de anti-IL-6 estudadas no sensor LFA, baseadas na avaliação óptica.

<b>Etapa</b>	<b>Conc. de anti-IL-6 (µg/mL)</b>	<b>Nº. de testes (%)</b>	<b>Nº. de testes com sinal colorimétrico</b>	<b>Nº. de testes pareados com curva padrão</b>
<b>1</b>	<b>400</b>	13 (59,1)	8 (61,5%)	<b>Curva ausente</b>
	<b>600</b>	9 (40,9)	7 (77,7%)	<b>Curva ausente</b>
<b>2</b>	<b>600</b>	24 (21,4)	12 (50%)	11(45,8)
<b>3</b>	<b>800</b>	66 (58,9)	60 (90,9%)	46 (69,6%)

#### **5.4. Validação do ensaio LFA para IL-6 – *Quick-IL test* (IL-6)**

##### **5.4.1 Validação do ensaio LFA pela curva padrão colorimétrica**

Os teste realizados com as curvas padrões colorimétricas foram realizados em duplicatas.

As tiras testadas com tampão de lavagem, PBS independente das concentrações de Tween 20<sup>®</sup>, apresentaram resultados negativos em 100% das tiras.

A reprodutibilidade do padrão foi avaliado entre as duplicatas após a quantificação com ImageJ. Foram feitas 100 medidas de área para cada tira nas diferentes concentrações de IL-6 e o *Standard deviation* (SD) e *Standard error* (SE) calculado foi baseado nas médias das diferentes concentrações de anti-IL-6 no conjugado. Assim, para a concentração de 400,0 µg/mL (SD = 0,27; SE = 0,09); 600,0 µg/mL (SD = 0,21; SE = 0,10); 800,0 µg/mL (SD = 0,16; SE = 0,08).

O coeficiente de repetitividade (coeficiente de variação) entre as duplicatas foi de 70,2% para tiras com 400,0 µg/mL de anti-IL-6; 74,9% para as tiras com 600,0 µg/mL de anti-IL-6 e para 76,8% para as tiras com 800,0 µg/mL de anti-IL-6.

A melhor precisão entre as curvas padrão foram para os testes realizados com as tiras contendo 800,0 µg/mL de anti-IL-6. A boa precisão foi avaliada através da menor variação ou distanciamento em que o valor indicado se deu do alvo, ou seja, os valores menor de SD e SE.

Foram realizados testes de seletividade com as citocinas IL-8, IL-10 e IL-12 e não houve marcação em nenhuma das tiras testadas.

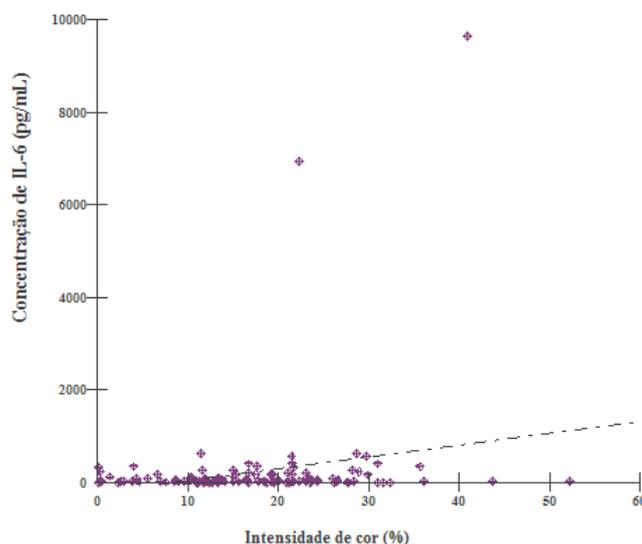
#### 5.4.2 Validação do ensaio LFA com o grupo LV

A avaliação do fluxo da amostra mostrou-se satisfatório para 121 (88,9%) testes. O tempo de fluxo médio foi inferior a 5 minutos para 118 (86,7%) das amostras testadas. Dezoito amostras (13,2%) não fluíram para a membrana do conjugado por apresentarem volume reduzido ou viscosidade aumentada.

Não foram realizadas duplicatas das amostras reais do grupo de pacientes com LV por insuficiência de material, desta forma não foram calculados os índices de repetitividade e reprodutibilidade.

Sabendo que IL-6 é mensurado quantitativamente, para validação do teste LFA foi necessário considerar um padrão ouro de mensuração, no caso, a medida realizada por CBA (variável dependente) e o novo teste a variável independente, o qual foi considerado o parâmetro de percentual de intensidade de cor. A exatidão e validação do teste foi dada por uma regressão linear positiva entre os testes ( $r = 0,2218$ ;  $p = 0,0159$ ) figura 24.

**Figura 24.** Regressão linear simples entre a concentração de interleucina 6 medida por citometria de fluxo e o percentual de intensidade de cor quantificado no ImageJ para as amostras mensuradas no sensor de fluxo lateral. Valor de  $p < 0,0159$ . Coeficiente de correlação,  $r = 0,2218$ .



. Fonte: Autoria própria, 2018

Os valores preditivo positivo, preditivo negativos e acurácia dos testes não foram calculados pela ausência de mensuração das amostras do grupo controle saudáveis.

## Seção IV

### 5.4 Aplicativo de leitura para dispositivos móveis

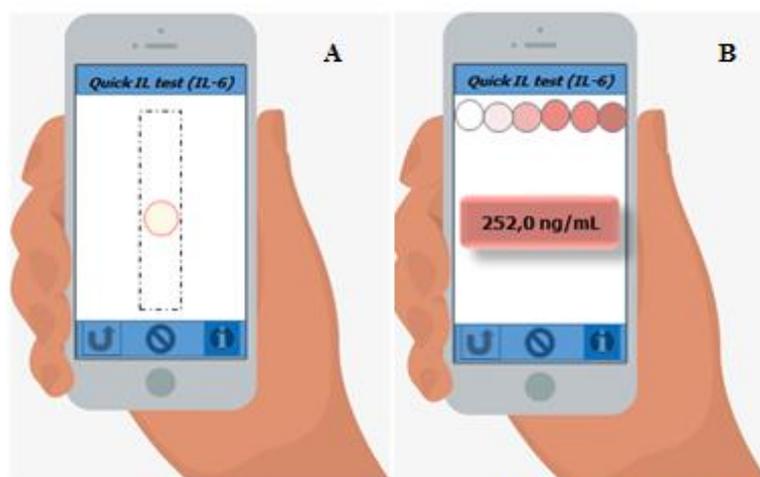
Os testes iniciais, com as tiras já secas de curva padrão mostraram-se satisfatórios, porém a intensidade de sinal fraca, limitou a precisão da associação do sinal colorimétrico com o valor absoluto estimado. As diferenças de posicionamento das marcações de teste e controle limitaram a precisão da interpretação.

Imagens de arquivo, originadas por câmera de celular, que foram realizadas de tiras a fresco, momento em que o teste foi realizado, apresentaram uma melhor intensidade do sinal colorimétrico e resultando uma interpretação mais precisa.

Após a implementação de captura da imagem utilizando a câmera nativa do dispositivo e em seguida com a foto já adquirida e exibido na tela do celular pelo App, foi possível segmentar e selecionar na imagem, manualmente com o intuito de limitar a imagem no círculo, área de teste. Esse processo do aplicativo, detectou a cor indicada na imagem, no entanto a tentativa de classificação de acordo com a escala padrão não foi satisfatória.

O *layout* do dispositivo está ilustrado na figura 25.

**Figura 25.** Esquema representativo do aplicativo de leitura colorimétrica para o *Quick IL test (IL-6)*. (A) Ilustração da tela de captura de imagem do dispositivo, ressaltando a área de teste; (B) Ilustração do processamento de leitura quantitativa de acordo com a curva padrão colorimétrica.



Fonte: Autoria própria, 2018.

## 6 DISCUSSÃO

### 6.1. Desenvolvimento do protótipo

A escolha dos materiais e suas características são fundamentais para o processo de padronização e desenvolvimento de um dispositivo de qualidade. Desta forma, a escolha dos filtros utilizados como filtro de amostra, suporte do conjugado, membrana de teste e absorvente levou em consideração várias características sendo o tempo de fluxo da amostra a principal delas (MILLIPORE, 2013).

A membrana receptora de amostra levou em conta parâmetros que influenciam na taxa de liberação da amostra, principalmente a espessura e gramatura e a pressão exercida dentro da tira. Entre filtros de celulose ou malhas de algodão a opção por utilizar a membrana de celulose ocorreu devido a sua capacidade de receber volumes maiores de amostra sem prejudicar a uniformidade de dispersão, apresentar capacidade de pré-tratamento permitindo regulação do pH, modulação da força iônica, manutenção da viscosidade e bloqueio de ligações inespecíficas na reação e transporte para a membrana do conjugado. Os filtros de celulose apresentam um baixo custo, são fáceis de manusear, práticos, suas características de corte são simples, permitindo o corte em diâmetros variados. Tais características fazem destas membranas as mais utilizadas nos LFA (MILLIPORE, 2013; PAROLO; MERKOCI, 2013; GE et al., 2014; SAJID; KAWDE; DAUD, 2014).

O suporte de conjugado escolhido foi o composto por microfibras de vidro, material amplamente utilizado como suporte do conjugado por ser imunologicamente inerte, evitando que imunoglobulinas da amostra fiquem retidas no filtro. Apesar de menos importante, a capacidade de absorção de variadas quantidades de solução tampão suficientes para diluir e carrear a amostra deve ser garantida. Outra característica importante a ser considerada por esta fibra, é sua capacidade de bloquear ligações inespecíficas entre Ags e Abs, preservando a qualidade do teste, características que fazem desta fibra a mais utilizada entre as de celulose e poliéster de superfície modificada (LEUVERING et al., 1980; MILLIPORE, 2013; SAJID; KAWDE; DAUD, 2014).

A membrana de nitrocelulose, ou membrana de teste é a membrana primordial, fundamental para o perfeito desempenho do teste. A escolha da membrana HF180, apresenta boa reatividade e costuma ser a membrana mais utilizada em testes rápidos para diagnósticos em humanos (CHEN et al., 2014; JIANG et al., 2015; LIN et al., 2015; DONG et al., 2017). A classificação “HF” - *High flow* - alto fluxo, ocorre em virtude do fluxo de corrida, 180 segundos

por 6 centímetros de membrana. A detecção pontual do teste e controle na membrana são requisitos absolutos do bom desempenho do sistema. Levou-se em considerações parâmetros que respeitassem o fluxo lateral dinâmico, uma vez que os constituintes químicos envolvidos estão constantemente se movendo através de materiais para alcançar um equilíbrio, possibilitando a formação de imunocomplexos (teste e controle) em um período de tempo pré estabelecido (20 minutos). Assim, foram considerados os padrões de fluxo na membrana (viscosidade vs porosidade), tempo de reação molecular entre Abs-Ags, comprimento do percurso na tira LFA para considerar a eficácia do sistema escolhido (ZHANG et al., 2006; LONNBERG; CARLSSON, 2001; OKU et al., 2001, ZHU et al., 2002; MILLIPORE, 2013; SHARMA et al., 2015).

A aplicação dos reagentes de captura (Abs primário e Abs secundário) sobre a membrana de nitrocelulose e o suporte do conjugado, além da largura no corte das tiras, permitindo a precisão do tamanho do filtro e montagem no cartão suporte são passos que requerem uma uniformidade muito grande visando garantir a reprodutibilidade do teste, uma vez que é possível controlar a quantidade exata de reagentes que entram no teste (150,0 µL). Estes passos não foram rigorosamente seguidos nas etapas iniciais de padronização, uma vez que não se sabia o tamanho de tira ideal para o volume de amostra testado inicialmente. Desta forma, a padronização da curva de calibração inicial, com 600,0 µg/mL de anti-IL-6, resultou em uma coloração gradual ascendente, mas não perfeitamente crescente de forma linear na intensidade de cor para todas as concentrações e não muito consistente entre as duplicatas. Estes fatores foram corrigidos quando utilizamos 800,0 µg/mL de anti-IL-6 no conjugado. Desta forma, as curvas de calibração tiveram mais pontos de diluições para a proteína IL-6 pura inclusos, melhorando o índice de inclinação da reta e com um menor SD entre as duplicatas, de acordo com experimentos de validação (CLEOPHAS; DROOGENDIJK; VAN OUWERKERK, 2008).

A posição dos pontos de teste e controle nos testes preliminares, passou por alterações de posicionamento para melhorar a intensidade dos sinais, não permitindo a competitividade entre os reagentes. A padronização estabelecida (25mm e 35mm) para os pontos de controle e teste, respectivamente, a partir da região distal da tira, resultou em uma linearidade de leitura e interpretação na quantificação dos resultados, estando de acordo com alguns autores (PAEK et al, 2007; POSTHUMA-TRUMPIE; KORF, AMEROGEN, 2009; MILLIPORE, 2013).

Sabe-se que a automatização contando com uma plataforma computadorizada calibrada e precisa, resultaria em uma melhor padronização das marcações dos Abs teste e controle, porém, além do investimento no equipamento, o sistema exigiria um volume maior destes

anticorpos aumentando o custo de produção (TANAKA et al., 2006; XU et al., 2009; CHOI et al., 2010).

A opção por utilizar ouro coloidal, reagente atóxico, de preparo simples e reprodutível, com padrão de coloração estável cuja revelação permite a visualização óptica, justificou a escolha do nanocomposto como marcador com Anti-IL-6 para conjugação no teste. Utilizou-se o citrato de sódio como agente redutor, pois de acordo com a literatura, através do método de Turkevich, teríamos AuNPs com diâmetro médio de 14 nm, ilustrado nas figuras de 16 a 18 (GOODSELL, 2004; KIMLING et al., 2006; DREXLER, 2007; SPERLING; PARAK, 2010; FARIA-TISCHER; TISCHER, 2012; GUBALA et al., 2012; HOLZINGER; LE GOFF; COSNIER; 2014; ALDEWACHI et al., 2017).

O teste de agregação das nanopartículas em solução de NaCl a 10% evidenciou que as concentrações de 200,0 µg/mL; 400,0 µg/mL; 600,0 µg/mL e 800,0 µg/mL de anti-IL-6 no conjugado são satisfatórios para a montagem do teste LFA. A opção por utilizar as concentrações mais altas ocorreu em virtude da maior intensidade de sinal colorimétrico e de maior homogeneidade entre as duplicatas (PAROLO; ESCOUSA-MUNIZ; MERCOÇI, 2013; ALDEWACHI et al., 2017).

Foram realizadas combinações de AuNPs/Anti-IL-6 nas concentrações de 200,0 µg/mL; 400,0 µg/mL; 600,0 µg/mL e 800,0 µg/mL, pois iniciamos os testes preliminares baseados em experimentos LFA com outras proteínas e não tínhamos parâmetros de funcionalidade para a proteína proposta (BÜHRER-SÉKULA et al., 2003; CHOI et al., 2004; CHOI et al., 2010; DONG et al., 2017). As tiras com 400,0 µg/mL; 600,0 µg/mL e 800,0 µg/mL de anti IL-6 no conjugado, tiveram marcação pontual satisfatória, linear, e apresentaram um menor SD e SE em relação as tiras de teste com concentração de 800,0 µg/mL.

O protótipo do teste rápido para detecção de IL-6 foi satisfatório, uma vez que foi obtida uma intensidade de coloração crescente, de acordo com o aumento da concentração da proteína pura, para a curva padrão em ng/mL, evidenciado pela eficiência da curva de 98,7%. Os testes considerados semi-quantitativo, isto é, que geram intervalos para as diferentes concentrações permitindo uma alteração de cor, com características para visualização óptica e de acordo com as diluições seriadas realizadas, houve um aumento crescente. Neste estudo, foi realizado diluições para as concentrações de 0, 10, 50, 100, 500, 1.000, 2.500, 5.000 e 10.000 ng/mL de IL-6, como em outros testes LFA com satisfatório grau de detecção (NAGATAMI et al., 2006; TANAKA et al., 2006; POSTHUMA-TRUMPIE; KORF, AMEROGEN, 2009; CHOI et al., 2010; WANG et al., 2011). A tentativa de obtenção da curva padrão em pg/mL não foi satisfatória pois, obtivemos sinal, porém com um menor percentual de linearidade e

repetitividade dos níveis intensidade de cor, também de acordo com outros estudos que para obtenção da curva padrão satisfatória e melhores LD utilizaram outras estratégias de conjugado como a dupla conjugação de AuNPs, de distintos tamanhos para amplificação do sinal (CHOI et al., 2010); alteração do diâmetro das AuNPs no conjugado 40nm também foi outra estratégia para diminuir o LD e melhorar a intensidade de sinal para HCG e PSA (TANAKA et al., 2006; NAGATANI et al., 2006).

Neste estudo, os parâmetros testados para se obter a linearidade dos pontos da curva padrão em pg/mL foram alterações nas concentrações de Tween 20<sup>®</sup> no tampão de corrida e membrana receptora de amostra, mas na tentativa de construção da curva os pontos de diluição com concentrações mais elevadas marcaram satisfatoriamente e os com concentrações inferiores a 1.000 pg/mL quando marcaram, não houve linearidade, fazendo-se necessário mais testes e ajustes de parâmetros para melhor calibração da curva padrão para estas concentrações.

O processo completo de validação do teste rápido utilizando amostras reais, grupo de pacientes LV, não foi possível, uma vez que o volume de plasma para as tiras eram insuficientes para realização dos mesmos em duplicatas, como sugerido no processo de validação (CLEOPHAS; DROOGENDIJK; VAN OUWERKERK, 2008). Assim, o processo de validação do teste, para alguns parâmetros, deu-se pela curva padrão de 800,0 µg/mL de anti-IL-6, evidenciado através dos valores de (SD = 0,16; SE = 0,08), que de acordo com CLEOPHAS; DROOGENDIJK; VAN OUWERKERK, 2008, os índices de SD ideais devem estar entre 10 – 20% e os valores de SE inferiores a 10%, caracterizando bons níveis de reprodutibilidade, repetitividade e precisão.

As análises comparativas entre as quantidades de IL-6 mensurada por CBA quando comparados com as quantificações realizadas no sensor LFA, cujos valores foram transformados em percentual de intensidade de cor apresentaram uma correlação linear positiva leve ( $r = 0,2218$ ;  $p = 0,0159$ ). Tal fato pode ser explicado pela dificuldade de interpolação dos percentuais de intensidade de cor das tiras teste com amostras reais, com as concentrações compatíveis referenciadas pela curva padrão. O programa ImageJ transforma qualquer coloração, sombra ou tonalidade amarelada, em escalas de cinza e estes interferentes aumentaram o percentual de intensidade de cor das amostras (RASABAND, 2011). No entanto, um razoável percentual de amostras reais mostraram-se compatíveis com a curva padrão na inspeção óptica (63,3%).

Os fatores que nos impediram de realizar outras análise estatísticas entre os teste LFA e a CBA foram: 1. Interferentes na coloração do plasma (proteínas, bilirrubinas e hemácias), que consequentemente influenciaram na coloração pontual; 2. Viscosidade aumentada, impedindo

a fluidez na membrana por entupir os poros; 3. Excesso de fluidez, permitindo que o plasma adentre a membrana sem que tenha tempo hábil de se ligar ao conjugado AuNPs/Anti-IL-6 (POSTHUMA-TRUMPIE; KORF, AMEROGEN, 2009).

Os testes realizados com amostras de pacientes com sepse, originados de UTI, não apresentaram compatibilidade na marcação pontual, uma vez que as amostras de plasma eram muito amareladas e apresentavam um aspecto muito fluido, parecendo não permitir a ligação da proteína com o Abs no conjugado. Ao pingar o plasma notou-se uma facilidade do líquido penetrar na membrana receptora de amostra que rapidamente invadiu a membrana do conjugado e a zona de detecção sem configurar ligação Ags-Abs na marcação pontual, nem tão pouco para o controle. Assim, para estas amostras o teste foi insatisfatório. Tal fato ocorreu para 6/8 pacientes testados. Tal fato parece acontecer porque os pacientes em UTI apresentam-se icterícos e a coloração do plasma pareceu influenciar e ser um confundidor na tonalidade de cor, assim como outros fatores que podem influenciar a alteração de coloração em testes rápidos (YU et al., 2018). A influência da fluidez deve ocorrer por haver um excesso de hidratação venosa destes pacientes (POSTHUMA-TRUMPIE; KORF, AMEROGEN, 2009).

O aumento da viscosidade e fluidez neste estudo influenciaram por utilizarmos amostra de plasma congelada e não fresca. É provável que a utilização de amostras de sangue fresco, onde adaptaríamos uma membrana específica para receber sangue, a qual faria a separação de plasma das hemácias, muito provavelmente resolveríamos este fator de influência (ALSHTROM, 2010; MILLIPORE, 2013; PAROLO; MERCOÇI, 2013).

As tiras testadas para os pacientes com sepse apresentaram coloração amarelada, não correspondendo com as concentrações do padrão ouro, CBA, com o percentual de coloração estabelecido pelo programa ImageJ.

Todos os pacientes em UTI apresentavam HIV e o perfil de citocinas mensuradas mostrou-se diferentes dos valores habituais, quando comparado aos pacientes coinfectados com HIV-1/*Leishmania*. IL-6 em especial, não apareceu tão aumentada, como esperado. Tal fato também pode ser justificado pela meia vida de IL-6, que embora permaneça circulante por até 10 dias, sua meia vida é diferente para as vias de produção de gp80 e gp130 e a obtenção das amostras de plasma destes pacientes foi entre 2 a 7 dias após o diagnóstico clínico de sepse, que muitas vezes também não é coincidente com o ápice de produção, baseado no grau da inflamação sistêmica (GERHARTZ et al., 1994; NAPOLITANO, 2018).

A quantificação dos níveis de IL-6 por CBA apresenta custo elevado e a técnica ainda é pouco aplicada na rotina diagnóstica devido à complexidade dos kits disponíveis no mercado. Neste estudo a utilização da técnica, considerada padrão ouro, foi utilizada para realizar

associações com fatores clínicos da LV grave e seus valores foram considerados de referência para validação do teste rápido LFA, já relatados anteriormente, com uma correlação positiva fraca, devido aos interferentes mencionados.

O desenvolvimento do App para dispositivos móveis vem se mostrando eficaz nas etapas as quais, nos propomos a desenvolver, no entanto, fatores ambientais intermediários ao teste e aquisição da imagem pelo dispositivo parecem requerer alguns algoritmos para ajustes de funcionalidade do App. A literatura relata o desenvolvimento de *softwares* para dispositivos móveis permitindo a leitura de valores absolutos para estes tipos de testes rápidos, com boa aceitação, padronização e funcionalidade (ZHOU, et al., 2015; ZHANG; LIU, 2016; DONG et al., 2017).

## 6.2 Interleucina 6 na LV grave

Foram mensurados IL-6 no plasma de 101 pacientes com LV e o resultado das dosagens foram superiores aos níveis basais das citocinas mensuradas em pacientes assintomáticos e sadios (WONG et al., 2008; HOSNIJEH et al., 2010; HUNTER; JONES, 2015).

Os fatores prognósticos utilizados para avaliar a gravidade clínica da LV são muitos (WERNECK et al., 2003; COSTA, 2009; COSTA et al., 2010; SAMPAIO et al., 2010; COSTA et al., 2013; SENE, 2103; ZACARIAS et al., 2017). Neste estudo, além das variáveis demográficas (idade e sexo) e estados nutricionais (relato de perda de peso, percentual de peso perdido), foram avaliados: relato de febre, febre > 39 °C, palidez, tamanho do baço, irritabilidade, fadiga, vômito, sonolência, falta de apetite, diarreia, dor abdominal, tosse, falta de ar, oligúria, edema, sangramentos, icterícia, dispneia, raio-x de pulmão normal, esplenomegalia, hepatoesplenomegalia, infecção do trato urinário, insuficiência renal crônica, pneumonia, sepse e coinfeção HIV-1/*Leishmania*.

Níveis mais elevados de IL-6 foram observados nas pessoas com febre, fadiga, perda de peso, presença de petéquias, vomito, epistaxe e icterícia, mesmo que os níveis não tenham se mostrado estatisticamente significantes, mas concordantes com outros estudos (COSTA et al., 2013; SENE, 2103).

A citocina IL-6 foi considerada uma interleucina central no prognóstico de morte (COSTA et al., 2013; COSTA et al., 2016). Peruhype-Magalhães et al. (2006) relataram o aumento desta citocina em pacientes com LV clássica. Em nosso estudo, esta citocina apresentou-se aumentada quando correlacionada com os fatores: hemorragia, sepse e óbito, também de acordo com os relatos sobre doença grave (COSTA et al., 2013; COSTA et al.,

2016). Barral-Neto et al. (1991) relataram um aumento da citocina IL-6 na doença ativa. Acredita-se que esta citocina exerça papel modulador de diferenciação de células T CD4+ em Th1 ou Th2 (KEMP et al., 1994; KAMANAKA et al., 1996). Acredita-se que este direcionamento para Th2 é o responsável pela produção de IL-4 e inibição de INF- $\gamma$ . É importante considerarmos também que estudos da fase aguda de sepse, malária e dengue identificaram IL-6 e TNF- $\alpha$  aumentados como verificamos neste estudo (CLARK et al., 2004; DEVIGNOT et al., 2010; SKIRECKI et al., 2012).

Diante do número de estudos que relacionam níveis elevados de IL-6 a gravidade da LV, realizamos os testes de probabilidade de morte (PM) no programa *Kala-Cal*<sup>®</sup> e verificamos que pacientes deste estudo, com maior probabilidade de morte apresentavam níveis mais elevados de IL-6, como relatado pelos autores no desenvolvimento da pesquisa que deu origem ao programa (COSTA et al., 2016).

Homens e pacientes com idade superior a 18 anos, apresentaram PM mais elevadas, provavelmente porque nestes grupos estão alocados os pacientes com coinfeção HIV-1/*Leishmania*, uma vez que a PM foi superior neste grupo de pacientes. A relação da LV com HIV-1 já é bastante conhecida. Trata-se de uma doença oportunista comum entre pacientes imunosuprimidos (CRUZ et al., 2006). Neste estudo, pacientes coinfectados com HIV-1/*Leishmania* apresentaram níveis mais elevados de IL-6, como já relatado em outro estudo, que comparou o papel das interleucinas tanto na medula óssea como no sangue periférico (BRAZ, 2016). É possível que a diferença no perfil das respostas imunes destes pacientes sejam inerentes a uma resposta celular e humoral (MOLINA; GRADONI; ALVAR, 2003), o que favorece o risco de infecção e desenvolvimento da doença (ASHFORD, 2000; MORENO et al., 2000; CHAPPUIS et al., 2007). Pacientes imunosuprimidos apresentam resposta imune-celular comprometida. Além disto, alterações imunológicas causadas pelo HIV-1 são particularmente favoráveis à multiplicação exacerbada do parasito (EZRA; OCHOA; CRAFT, 2010). Associações com resposta imune de pacientes coinfectados, HIV-1/*Leishmania*, também estão associadas com aumento da quantidade de parasitas no sangue periférico e medula óssea (SENE, 2013; ZACARIAS et al., 2017).

IL-6 não está restrita à resposta imune, uma vez que a mesma atua na hematopoiese, trombopoiese, formação de osteoclastos, resposta hepática de fase aguda, resultando na elevação da CRP (RAMAMOORTHY et al., 2012; TULEK et al., 2013). Neste estudo a correlação de IL-6 com CRP foi positiva, mostrando que o processo inflamatório na LV é caracterizado por elevação do VHS, enzimas hepáticas, CRP, hipoalbuminemia, presença de edema, icterícia, pancitopenia, elevação nos níveis de algumas citocinas, entre elas a IL-6. Essas

alterações podem anteceder o desequilíbrio da coagulação sanguínea, resultando em sangramento (COSTA et al., 2103). Desta forma, como verificamos em nosso estudo, sangramento e óbito também estão correlacionados com níveis elevados de CRP.

A CRP é considerada fator estimulatório da produção do fator tissular em monócitos, contribuindo para o desenvolvimento da coagulação intravascular disseminada e trombose em estados de inflamação (CERMAK et al., 1993). Assim, diante de um quadro inflamatório crônico, em pacientes com LV, pode predispor distúrbios na coagulação sanguínea, que são intensificados em casos de infecções bacterianas. Kao et al. (2015) observaram que pacientes com cirrose hepática grave, apresentaram sangramento de varizes associados a cultura bacteriana positiva e estes estavam associados ao desfecho letal e a níveis elevados CRP. Este estudo também observou níveis elevados de IL-6 com a via STAT3.

O estudo de associações clínicas com IL-6 e CRP mostraram-se semelhantes para ambas as características de gravidade da LV (sepse, hemorragias e óbito), com exceção da coinfeção HIV-1/*Leishmania*, que mostrou-se associada apenas com IL-6.

A análise dos números (níveis de IL-6 e CRP) frente as variáveis estudadas nos sinaliza que níveis de IL-6 estão em proporções de aumento muito superiores em relação aos níveis de CRP, talvez este fato justifique que maior número de estudos que associem níveis de citocinas com doença grave (SENE, 2013; COSTA et al., 2013; COSTA et al., 2016; DOS SANTOS et al., 2016, ZACARIAS et al, 2017) as comparações de estudos realizados com CRP (WASUNNA et al., 1995; SINGH et al., 1999; GASIM; THEANDER; ELHASSAN, 2000). Um estudo de revisão, onde é relatado IL-6 como marcador para várias patologias, identificou a citocina um marcador mais fidedigno que CRP, quando comparados ambas (HUNTER; JONES, 2015), pois não se sabe, exatamente se todas as vias de estímulo para a produção de IL-6 estão correlacionadas ao aumento de CRP.

Este estudo vem reforçar estudos anteriores e suas associações com os fatores que levam ao agravo da LV e conseqüentemente a morte (SENE, 2013; COSTA et al., 2013; DOS SANTOS et al., 2016). Concentrações de IL-6 acima de 200,0 pg/mL associam-se significativamente à probabilidade de morte (DOS SANTOS et al., 2016). Enquanto indivíduos saudáveis não apresentam IL-6 em níveis detectáveis (0 a 5 pg/mL) e aqueles com LV apresentaram variação de 2,0 a 103,0 pg/mL (VAN DER POLL; ZIJLSTRA; MEVISSSEN, 1995) porém em nossos grupo de estudo, obtivemos pacientes com níveis de IL-6 superior a 8.000,0 pg/mL evidenciando o intenso grau de inflamação. Considerando que pacientes com LV, mesmo que em estágios iniciais da doença já apresentam níveis elevados de IL-6, a

detecção desta interleucina como fator de pré disposição de morte pode antecipar terapias intervindo no não agravamento da doença.

Diante destas perspectivas, a nova tecnologia descreve um novo e inventivo sensor de fluxo lateral para detecção de interleucina 6 utilizando nanopartículas de ouro e marcação pontual na linha de teste para visualização óptica. O sistema é sensível, específico, seletivo, prático, portátil, rápido de fácil reprodutibilidade e de baixo custo para produção.

## 7 CONCLUSÕES

1. Um dispositivo simples para detecção rápida da interleucina 6 foi caracterizado utilizando um teste rápido, baseado nos princípios imunocromatográficos, que utiliza nanopartículas de ouro para visualização óptica e marcação pontual na linha de teste, resultando um dispositivo de baixo custo para produção.
2. O teste LFA com 4 membranas distintas e AuNPs/Anti-IL-6, como reagente cromógeno no conjugado, na concentração de 800,0 µg/mL, foi o melhor modelo padronizado.
3. A padronização da curva padrão a partir da proteína recombinante IL-6 (0 – 10.000,0 ng/mL) mostrou-se satisfatória seguindo padrão de intensidade de cor, permitindo a criação de intervalos de coloração correspondentes com a quantidade da proteína utilizada, caracterizando o teste como quantitativo.
4. O modelo de regressão linear simples correlacionou fracamente a citometria de fluxo com a nova tecnologia, o LFA.
5. O dispositivo LFA foi caracterizado como teste rápido por apresentar resultado em 20 minutos, simples, por ser de visualização óptica e não necessitar de profissional habilitado para interpretação.
6. O processo de validação caracterizou o produto como reprodutível, preciso e seletivo, com satisfatório fluxo de migração e bom coeficiente de repetitividade.
7. O *software* para dispositivos móveis realiza a captura da imagem, processa e transforma algoritmos de cor, com baixa correspondência com a curva padrão.
8. A IL-6 mostrou-se associada a sepse, sangramentos e óbito nos pacientes com LV.
9. Pacientes graves, com PM moderada apresentaram elevados níveis de IL-6 e CRP.
10. O aumento de IL-6 está substancialmente correlacionado com CRP.
11. Pacientes com coinfeção HIV-1/*Leishmania* apresentaram maior PM e níveis elevados de IL-6 e CRP.

## 8 PERSPECTIVAS FUTURAS

Este estudo reforça a IL-6 como característica pré-dispositora de morte em pacientes com LV.

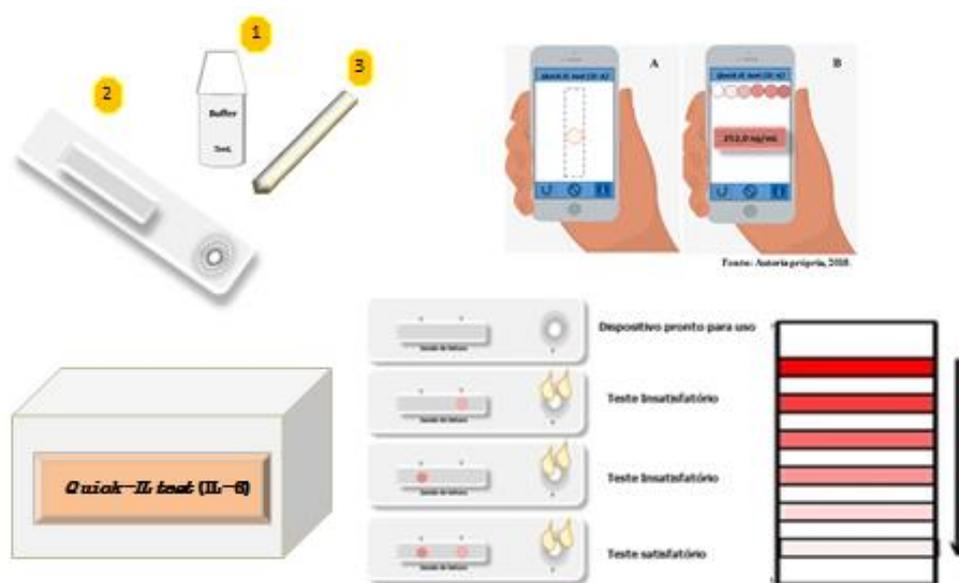
O teste rápido poderá antecipar o diagnóstico dos pacientes que estão suscetíveis a desenvolver a LV de forma grave e através de terapias Anti-IL-6, evitem o desenvolvimento do quadro imunológico agudo.

O desenvolvimento da tecnologia deste estudo resultou em um novo e inventivo dispositivo para detecção rápida não apenas da IL-6 e sim protótipo molde para várias proteínas.

O desenvolvimento do Kit *Quick-IL test* (IL-6), composto por: dispositivo teste (20 unidades) embaladas individualmente, frasco de solução de corrida 5,0 mL, pipeta sorológica graduada, (figura 26), é uma grande perspectiva.

O teste LFA *Quick-IL test* (IL-6) permitiu o desenvolvimento de uma nova tecnologia, os leitores para dispositivos móveis, em fase de aprimoramento e teste.

**Figura 26.** Ilustração dos elementos que compõem o Kit *Quick-IL test* (IL-6). 1. Frasco de solução de corrida 5,0 mL; 2. Dispositivo teste, pronto para uso; 3. Pipeta sorológica graduada.



Fonte: Autoria própria, 2018

**REFERÊNCIAS BLIOGRÁFICAS**

AKIRA, S.; HIRANO, T.; TAGA, T.; KISHIMOTO, T. Biology of multifunctional cytokines: IL 6 and related molecules (IL 1 and TNF). **FASEB J.** v. 4, n. 11, p. 2860-7, 1990.

ALDEWACHI, H. Gold nanoparticle-based colorimetric biosensors. **Nanoscale.** v. 10, n. 1, p. 18-33, 2017.

ALSHTROM, Liquid Filtration. 2010.

ALVAR, J. et al. Leishmania and human immunodeficiency virus coinfection: the first 10 years. **Clin Microbiol Rev.** v. 10, n. 2, p. 298-19. 1997.

ALVAR, J. et al. WHO Leishmaniasis Control Team. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **PLoS One.** v. 7, n. 5, p. e35671. 2012.

ALVARENGA, D. G. et al. Visceral leishmaniasis: retrospective study on factors associated with lethality. **Rev Soc Bras Med Trop.** v. 43, n. 2, p. 194-7. 2010.

ALVES, C. F. et al. American tegumentary leishmaniasis: effectiveness of an immunohistochemical protocol for the detection of Leishmania in skin. **PloS one.** v. 8, n. 5, 2013.

ALVES, W. A. Leishmaniose visceral americana: situação atual no Brasil. **Bepa.** v. 6, n. 71, p. 25-29. 2009.

ANSARI, N. A.; SALUJA, S.; SALOTRA, P. Elevated levels of interferon-gamma, interleukin-10, and interleukin-6 during active disease in Indian kala azar. **Clin Immunol.** v. 119, n. 3, p. 339-45. 2006.

ARAÚJO-SANTOS, T. et al. ANTI-parasite therapy drives changes in human visceral leishmaniasis-associated inflammatory balance. **Sci Rep.** v. 7, n. 1, p. 4334, 2017.

ASHFORD, R. W. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. **Int J Parasitol.** v. 30, n. 12-13, p.1269-81, 2000.

AWASTHI, A.; MATHUR, R.K.; SAHA, B. Immune response to Leishmania infection. **Indian J Med Res.** v.6, n.12. p. 238–258, 2004.

BACELLAR, O.; CARVALHO, E. M. Immunopathogenesis of visceral leishmaniasis. **Gaz Med.** v. 75, n. 1, p. 24-34. 2005.

BACELLAR, O. et al. M. IL-17 Production in Patients with American Cutaneous Leishmaniasis. **J Infect Dis.** v. 200, n. 1, p. 75–78, 2009.

BADARÓ, R.; DUARTE, M. I. S. Leishmaniose visceral (Calazar). **Tratado de infectologia:** Atheneu, São Paulo; vol. 2, cap. 97, p. 1234-1259. 1996.

BAPTISTA, P. et al. Gold nanoparticles for the development of clinical diagnosis methods. **Anal Bioanal Chem.** v. 391, n. 3, p. 943–50, 2008.

BARRAL, A.; COSTA, J. Leishmanias e a Leishmaniose Tegumentar nas Américas, 2011.

BEE, A. et al. Transformation of *Leishmania mexicana* metacyclic promastigotes to amastigote-like forms mediated by binding of C-reactive protein. **Parasit.** v.122, p. 521–529, 2001.

BELO, V. S. et al. Risk factors for adverse prognosis and death in American visceral leishmaniasis: a meta-analysis. **PLoS Negl Trop Dis.** v. 8, n. 7, p. e2982, 2014.

BIJU, V. Chemical modification sand bio conjugate reaction soft nano materials for sensing, imaging, drug delivery and therapy. **Chem Soc Rev.** v. 43, p. 744–764, 2014.

BODMAN-SMITH, K. B. et al. C-reactive protein-mediated phagocytosis of *Leishmania donovani* promastigotes does not alter parasite survival or macrophage responses. **Parasite Immunol.** v.24, n. 9-10, p. 447-54, 2002.

BRASIL, 2012. Ministério da Saúde. Resolução 466/2012.. Disponível em: <[http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/cns/2013/res0466\\_12\\_12\\_2012.html](http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/cns/2013/res0466_12_12_2012.html)>. Acesso em 10dez. 2017.

BRASIL, 2016a. Ministerio da Saúde.**Situação epidemiológica.** Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/leia-mais-o-ministerio/726-secretaria-svs/vigilancia-de-a-a-z/leishmaniose-visceral-lv/11334-situacao-epidemiologica-dados>.

BRASIL, 2016b. Ministério daa Saúde. Sistema de informação de agravos de notificação em saúde – Sinan. **Óbitos de Leishmaniose Visceral, Brasil, Grandes Regiões e Unidades**

**Federadas. 2000-2015.** Disponível em:

<<http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2016/novembro/08/LV-bitos.pdf>>. Acesso em: 10 dez. 2017.

BRASILEIRO FILHO, G. **Bogliolo Patologia**. 6 ed. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan. 2000.

BRAZ, D. C. **O papel da medula óssea no desenvolvimento da leishmaniose visceral grave: desvendando os mecanismos inflamatórios e imunossupressores**. 2016. 148f. Tese (Doutorado em Biotecnologia). Universidade Federal do Piauí, Teresina. 2016.

BRESLAUER, D. N. et al. Mobile phone based clinical microscopy for global health applications. **PloS One PloS One**. v. 4, n. 7, p. e6320, 2009.

BUECHLER, K.F. et al. Simultaneous detection of seven drugs of abuse by the Triage panel for drugs of abuse. **Clin Chem**. v. 38, n. 9, p. 1678–1684, 1992.

BÜHRER-SÉKULA, S. et al. Simple and fast lateral flow test for classification of leprosy patients and identification of contacts with high risk of developing leprosy. **J Clin Microbiol**. v.1, n. 5, p. 1991-5, 2003.

CALDAS, A. et al. Balance of IL-10 and interferon-gamma plasma levels in human visceral leishmaniasis: implications in the pathogenesis. **BMC Infect Dis**. v. 5, n. 113, p. 1471-34, 2005.

CAMPBELL, K. A. et al. CD40 ligand is required for protective cell-mediated immunity to *Leishmania major*. **Immunity**. v. 4, n. 3, p. 283-9. 1996.

CASTAÑEDA, M. T.; ALEGRET, S.; MERKOÇI, A. Electrochemical sensing of DNA using gold nanoparticles, **Electroanalysis**., v. 19, p. 743 – 753, 2007.

CERMAK, J. et al. C-reactive protein induces human peripheral blood monocytes to synthesize tissue factor. **Blood**, v. 82, n. 2, p. 513–520, 1993.

CHANDRA, H.; CHANDRA, S.; KAUSHIK, R. M. Visceral leishmaniasis with associated common, uncommon, and atypical morphological features on bone marrow aspirate cytology in nonendemic region. **J Trop Med**, v. 2013, ID 861032, 2013.

CHAPPUIS, F. et al. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? **Nat Rev Microbiol.** v. 5, n. 11, p. 873-82, 2007.

CHARMOY, M. et al. The prominent role of neutrophils during the initial phase of infection by Leishmania parasites. **J Biomed Biotechnol.** Article ID. 719361, 2010.

CHEN, W. et al. Development of an immunochromatographic lateral flow device for rapid diagnosis of Vibrio cholerae O1 serotype Ogawa. **Clin Biochem.** v. 47, n. 6, p. 448-54, 2014.

CHOI, S. et al. A rapid, simple measurement of human albumin in whole blood using a fluorescence immunoassay (I). **Clin Chim Acta.** v. 339, n. 1-2, p. 147-156, 2004.

CHOI, D. H. et al. A dual gold nanoparticle conjugate-based lateral flow assay (LFA) method for the analysis of troponin I. **Biosens Bioelectron.** v. 25, n. 8, p. 1999-2002, 2010.

CHUN, V. H. et al. Sensor based glucose biosensing system utilizing a smartphone as a signal reader. **J BioChip.** v. 8, n. 3, p. 218-226, 2014.

CHUNG, Y. C.; CHAEN, Y.L.; HSU, C. P. Clinical significance of tissue expression of interleukin-6 in colorectal carcinoma. **Anticancer Res.** v. 26, n. 5B, p. 3905-11, 2006.

CLARK, I. A. et al. Pathogenesis of malaria and clinically similar conditions. **Clin Microbiol Rev.**, v. 17, n. 3, p. 509-39, 2004.

CLEOPHAS, T. J.; DROOGENDIJK, J.; VAN OUWERKERK, B. M. Validating diagnostic tests, correct and incorrect methods and new developments. **CurrClin Pharmacol.** v. 3, n. 2, p. 70-6, 2008.

CONEP, 2017. Conselho Nacional de saúde. Disponível em:  
<[http://conselho.saude.gov.br/web\\_comissoes/conep/aquivos/resolucoes/resolucoes.htm](http://conselho.saude.gov.br/web_comissoes/conep/aquivos/resolucoes/resolucoes.htm)>.  
Acesso em: 10 dez. 2017.

COSTA, C. H. N. et al. Is severe visceral leishmaniasis a systemic Inflammatory response syndrome? – A case control study. **Rev da Soc Bras de Med Trop.**, v. 43, n. 4, p. 386-92, 2010.

COSTA, D. L. **Fatores de prognóstico na leishmaniose visceral: alterações clínicas e laboratoriais associadas à resposta imune, aos distúrbios da coagulação e à morte.** Minas Gerais-BH: 217 f. Tese originalmente apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical. Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, 2009.

COSTA, D. L. et al. Serum cytokines associated with severity and complications of kala-azar. **Pathog Glob Health**. v.107, n. 2, p. 78-87, 2013.

COSTA, D. L. et al. Predicting death from kala-azar: construction, development, and validation of a score set and accompanying software. **Rev Soc Bras Med Trop**. v. 49, n. 6, p. 728-740, 2016.

COTTERELL, S. E.; ENGWERDA, C. R.; KAYE, P. M. Leishmania donovani infection of bone marrow stromal macrophages selectively enhances myelopoiesis, by a mechanism involving GM-CSF and TNF-alpha. **Blood**. v.95, n. 5, p. 1642-51. 2000.

COURA-VITAL, W. et al. Prognostic factors and scoring system for death from visceral leishmaniasis: an historical cohort study in Brazil. **PLoS Negl Trop Dis**. v. 8, n. 12, e3374, 2014.

COURRET, N. et al. Biogenesis of Leishmania-harboured parasitophorous vacuoles following phagocytosis of the metacyclic promastigote or amastigote stages of the parasites. **J Cell Sci**. v. 1, n. 115, p. 2303-16, 2002.

CRUZ-AGUADO, J.; PENNER, G. Determination of ochratoxin a with a DNA aptamer. **J Agric Food Chem**. v. 56, n. 22, p. 10456-61, 2008.

CRUZ, I. et al. Leishmania/HIV co-infections in the second decade. **Indian J Med Res**. v. 123, n. 3, p. 357-88. 2006.

CULLEY, F. J. et al. C-reactive protein binds to a novel ligand on *Leishmania donovani* and increases uptake into human macrophages. **J Immunol**. v. 156, p. 4691-4696, 1996.

CULLEY, F. J. et al. C-reactive protein binds to phosphorylated carbohydrates. **Glycob**. v.10, p. 59-65, 2000.

CUI, X. et al. Establishing of a Method Combined Immunomagnetic Separation with Colloidal Gold Lateral Flow Assay and Its Application in Rapid Detection of *Escherichia coli* O157:H7. **Chin J Anal Chem**. v. 41, n. 12, p. 1812-1816, 2013.

DAVE, S.; BATISTA, E. L.; VAN DYKE, T. E. Cardiovascular Disease and Periodontal diseases: Commonality and causation. **Compend Contin Educ Dent**. v.25, n.7, Suppl 1, 2004.

DE ASSIS, R. R. et al. Glycoconjugates in New World species of Leishmania: polymorphisms in lipophosphoglycan and glycoinositolphospholipids and interaction with hosts. **Biochim Biophys Acta**. v. 1820, n. 9, p. 1354–65, 2012.

DE MOURA, T. R. et al. Cross-resistance of Leishmania infantum isolates to nitric oxide from patients refractory to antimony treatment, and greater tolerance to antileishmanial responses by macrophages. **Parasitol Res**. v.115, n. 2, p. 713-21. 2016.

DENKERS, E. Y.; BUTCHER, B. A. Sabotage and exploitation in macrophages parasitized by intracellular protozoans. **Trends Parasitol**. v. 21, n.1, p. 35-41, 2005.

DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. Comparative Immunology. **Comp Immunol Microbiol Infect Dis**. v. 27, p. 305–318. 2004.

DE OLIVEIRA, C. I.; BRODSKYN, C. I. The immunobiology of Leishmania braziliensis infection. **Front immunol**. v. 3, n. 6, p. 145, 2012.

DI CESARE, P. E. et al. Serum interleukin-6 as a marker of periprosthetic infection following total hip and knee arthroplasty. **J Bone Joint Surg Am**. v. 87, n. 9, p. 1921–27, 2005.

DIEHL, S. et al. Inhibition of Th1 differentiation by IL-6 is mediated by SOCS1. **Immunity**, v. 13, n. 6, p. 805–815, 2000.

DIEHL, S. et al. Induction of NFATc2 expression by interleukin 6 promotes T helper type 2 differentiation. **J Exp Med**. v. 196, n. 1, p. 39–49, 2002.

DONG, M. et al. Rapid and Low-Cost CRP Measurement by Integrating a Paper-Based Microfluidic Immunoassay with Smartphone (CRP-Chip). **Sensors (Basel)**. v.17, n. 4, pii: E684. doi: 10.3390/s17040684, 2017.

DOS SANTOS, P. L. et al. The Severity of Visceral Leishmaniasis Correlates with Elevated Levels of Serum IL-6, IL-27 and sCD14. **PLoS Negl Trop Dis**. v. 10, n. 1, p. e0004375, 2016.

DOS-SANTOS, W. L. C. et al. A case of conventional treatment failure in visceral leishmaniasis: leukocyte distribution and cytokine expression in splenic compartments. **BMC Infect Dis**. v.14: 491, 2014.

DREXLER, K. E. *Engines of Creation 2.0: The Coming Era of Nanotechnology*. 646pp. 2007.

DUARTE, M. I. S.; MARIANO, O. M.; CORBETT, C. E. P. Liver parenchymal cell parasitism in human visceral leishmaniasis. ***Virch Arch A Pathol Anat***. v. 89, n. 7, p. 73 – 76. 1989.

DUNBAR, B. S.; SCHWOEBEL, E. D. Preparation of polyclonal antibodies. ***Methods Enzymol***. v. 182, p. 663-670, 1990.

DUTRA, M. et al. Renal involvement in visceral leishmaniasis. ***Am J Kid Dis***. v. 7, n. 3, p. 22-27. 1985.

DZANTIEV, B.B. et al. Immunochromatographic methods in food analysis. ***Trac Trends Anal Chem***. v. 55, p. 81–93, 2014.

EDWARDS, K.A.; BAEUMNER, A. J. Optimization of DNA-tagged dye-encapsulating liposomes for lateral-flow assays based on sandwich hybridization. ***Anal Bioanal Chem***. v. 386, n. 5, p. 1335–1343, 2006.

ELLERBEE, A. K. et al. Quantifying colorimetric assays in paper-based microfluidic devices by measuring the transmission of light through paper. ***Anal Chem***. v. 81, n. 20, p. 8447–8452, 2009.

EZRA, N.; OCHOA, M. T.; CRAFT, N. Human Immunodeficiency Virus and Leishmaniasis. ***J Glob Infect Dis***. v. 2, n. 3, p. 248–257. 2010.

FARIA-TISCHER, P. C. S.; TISCHER, C. A. Nanobiotecnologia: plataforma tecnológica para biomateriais e aplicação biológica de nanoestrutura. ***BBR - Biochemistry and Biotechnology Reports***. v. 1, n. 1, 2012.

FERNANDEZ-SANCHEZ, C. et al. One-step immunostrip test for the simultaneous detection of free and total prostate specific antigen in serum. ***J Immunol Methods***. v. 307, n. 1-2, p. 1-12, 2005.

FERREL, L. D.; KAKAR, S. *Liver Pathology*. New York. 2011.

FRANCO, M. et al. *Patologia – Processos Gerais*. 5 ed. Rio de Janeiro. Atheneu. 2010.

FRAUNBERGER, P. et al. C-Reactive Protein Levels in Intensive Care Unit Patients. **Shock**. v. 26, n. 1, p. 10–12, 2006.

GABAY, C.; KUSHER, I. Acute - Phase Proteins and Other Systemic Responses to Inflammation. **N Engl J Med**. v.340, p. 448–54, 1999.

GAMA, M. E. et al. Subclinical form of the american visceral leishmaniasis. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. v. 99, n. 8, p. 889-93. 2004.

GAMA, M. E. et al. Severe visceral leishmaniasis in children: the relationship between cytokine patterns and clinical features. **Rev Soc Bras Med Trop**. v.46, n. 6, p. 741-5, 2013.

GASIM, S.; THEANDER, T. G.; ELHASSAN, A. M. .High levels of C-reactive protein in the peripheral blood during visceral leishmaniasis predict subsequent development of post kala-azar dermal leishmaniasis. **Acta Trop**. v. 75, n. 1, p. 35-8, 2000.

GAUTAM, S. et al. IL-10 neutralization promotes parasite clearance in splenic aspirate cells from patients with visceral leishmaniasis. **J Infect Dis**. v. 204, n. 7, p. 1134-7, 2011.

GE, X. et al. Nanomaterial-enhanced paper-based biosensors. **Trac Trends Anal. Chem**. v. 58, p. 31–39, 2014.

GERHARTZ, C. et al. Biosynthesis and half-life of the interleukin-6 receptor and its signal transducer gp130. **Eur J Biochem**. v. 223, n. 1, p. 265-74, 1994.

GONTIJO, C. M. F.; MELO, M. N. Leishmaniose visceral no Brasil, quadro atual, desafios e perspectivas. **Rev Bras Epidemiol**. v. 7, p. 338-349. 2004.

GOODSELL, D.S. Bionanotechnology: Lessons from Nature, New Jersey, USA. Wiley-Liss, Hoboken, 2004.

GORELIK, L.; CONSTANT, S.; FLAVELL, R. A. Mechanism of transforming growth factor beta-induced inhibition of T helper type 1 differentiation. **J Exp Med**. v. 195, n. 11, p. 1499-505. 2002.

GORYACHEVA, I. Y.; LENAIN, P.; DE SAEGER, S. Nanosized labels for rapid immunotests. **Trac Trends Anal Chem**. v. 46 p. 30–4, 2013.

GRADONI, L.; SCALONE, A.; GRAMICCIA, M. HIV-Leishmania co-infections in Italy: serological data as an indication of the sequence of acquisition of the two infections. **Trans R Soc Trop Med Hyg.** v. 87, n. 1, p. 94-6. 1993.

GROSSMAN, R. M. et al. Interleukin 6 is expressed in high levels in psoriatic skin and stimulates proliferation of cultured human keratinocytes. **Proc Natl Acad Sci.** v. 86, n. 16, p. 6367-71, 1989.

GUBALA, V. et al. Point of care diagnostics: status and future. **Anal. Chem.** v. 84, p. 487–515, 2012.

GUSSENHOVEN G. C. et al. LEPTO dipstick, a dipstick assay for detection of Leptospira-specific immunoglobulin M antibodies in human sera. **J Clin Microbiol.** v. 35, n. 1, p. 92–97, 1997.

HAINFELD, J. F.; POWELL, R. D. New frontiers in gold labeling. **J Histochem Cytochem.** v. 48, n. 4, p. 471–480, 2000.

HAMMOND, J. et al. Localized Surface Plasmon Resonance as a Biosensing Platform for Developing Countries. **Biosensors.** v. 4, n. 2, p. 172–188, 2014.

HEINRICH, P.C. et al. Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. **Biochem J.** v. 374, p. 1–20, 2003.

HERGENROEDER, G. W. et al. Serum IL-6: a candidate biomarker for intracranial pressure elevation following isolated traumatic brain injury. **J neuroinflammation.** v. 7, p. 19, 2010.

HERWALDT, B. L. Leishmaniasis. **Lancet.** v. 354, p. 1191-1199. 1999.

HIRANO, T. Revisiting the 1986 molecular cloning of interleukin 6. **Front Immunol.** v. 23, n. 5, p. 456-63, 2014.

HOLFORD, T. R. J.; DAVIS, F.; HIGSON, S. P. J. Recent trends in antibody based sensors. **Biosens Bioelectron.** v. 34, n. 1, p. 12–24, 2012.

HOLLAND, C.A.; KIECHLE, F.L. Point-of-care molecular diagnostic systems-past, present and future. **Curr Opin Microbiol.** v. 8, n. 5, p. 504-9, 2005.

HOLZINGER, M.; LE-GOFF, A.; COSNIER, S. Nanomaterials for biosensing applications: a review. **Front Chem.** v. 2, p. 63, 2014.

HOSNIJEH, F. S. et al. Stability and reproducibility of simultaneously detected plasma and serum cytokine levels in asymptomatic subjects. **Biomarkers.** v. 15, n. 2, p. 140-8, 2010.

HU, J. et al. Advances in paper-based point-of-care diagnostics. **Biosens. Bioelectron.** v. 54, p. 585–597, 2014.

HUANG, X. et al. Membrane-based lateral flow immunochromatographic strip with nanoparticles as reporters for detection: A review. **Biosens. Bioelectron.** v. 75, p. 166–80, 2015.

HUNTER, C. A; JONES, S. A. IL-6 as a keystone cytokine in health and disease. **Nat Immunol.** v. 16, n. 5, p. 448–457, 2015.

HUSSAIN, T. M.; KIM, D. H. C-reactive protein and erythrocyte sedimentation rate in orthopaedics. **Penn Orthopaedics J.** v.15, p. 13–6, 2002.

ILDIKO, B.V. et al. Sensitive ELISA Test for Determination of Ochratoxin A  
**J. Agric Food Chem.** v. 44, p. 4071–4074, 1996.

ISHIKAWA, H. et al. Proliferation of immature myeloma cells by interleukin-6 is associated with CD45 expression in human multiple myeloma. **Leuk Lymphoma.** v.39, n. 1-2, p. 51-5, 2000.

ISNARD, A.; SHIO, M. T.; OLIVIER, M. Impact of Leishmania metalloprotease GP63 on macrophage signaling. **Front Cell Infect Microbiol.** v. 2, n. 5, p. 72, 2012.

JIANG, W. et al. A novel dynamic flow immunochromatographic test (DFICT) using gold nanoparticles for the serological detection of *Toxoplasma gondii* infection in dogs and cats. **Biosens Bioelectron.** v. 15, n. 72, p. 133-9, 2015.

JONES, S.A. et al. The soluble interleukin 6 receptor: mechanisms of production and implications in disease. **FASEB J.** v. 15, p. 43–58, 2001.

JONES, S. A. Directing transition from innate to acquired immunity: defining a role for IL-6. **J Immunol.** v. 175, n. 6, p. 3463-8, 2005.

JONES, S.A.; SCHELLER, J.; ROSE-JOHN, S. Therapeutic strategies for the clinical blockade of IL-6/gp130 signaling. **J. Clin. Invest.** v.121, p. 3375–3383, 2011.

KADIVAR, M.R. et al. Childhood visceral leishmaniasis complicated by bacterial infections. **East Mediterr Health J.** v. 6, n. 5, p. 879-883. 2000.

KALOGIANNI, D. P. et al. Dry reagent dipstick test combined with 23S rRNA PCR for molecular diagnosis of bacterial infection in arthroplasty. **Anal Biochem.** v. 361, n. 2, p. 169–175, 2007.

KAMANAKA, M. et al. Protective role of CD40 in *Leishmania major* infection at two distinct phases of cell-mediated immunity. **Immunity.** v. 4, n. 3, p. 275-81. 1996.

KAO, J. et al. IL-6 significantly correlates with p-STAT3 expression and presents high variceal bleeding with mortality in cirrhotic patients: A cross-sectional study. **J Microbiol Immunol Infect.** v. 50, n. 3, p. 286-296, 2015.

KAVOSI, B. et al. Nanoparticles/PAMAM dendrimer functionalized wired ethyleneamine-viologen as highly efficient interface for ultrasensitive  $\alpha$ -fetoprotein electrochemical immunosensor. **Biosens. Bioelectron.** v. 59, p. 389–396, 2014.

KEMP, M. et al. Dichotomy of the human T cell response to *Leishmania* antigens. I. Th1-like response to *Leishmania major* promastigote antigens in individuals recovered from cutaneous leishmaniasis. **Clin Exp Immunol.** v. 96, n. 3, p. 410-5. 1994.

KETTLER, H.; WHITE, K.; HAWKES, S. Mapping the landscape of diagnostics for sexually transmitted infections. Geneva, WHO, 2004.

KIMLING, J. et al. Turkevich Method for Gold Nanoparticle Synthesis Revisited. **J Phys Chem. B.** v. 110, n. 32, p. 15700–1570, 2006.

KOETS, M. et al. A rapid lateral flow immunoassay for the detection of fungal  $\alpha$ -amylase at the workplace. **J Environ Monit.** v. 8, n. 9, p. 942–6, 2006.

KRAGSBJERG, P.; HOLMBERG, H.; VIKERFORS, T. Dynamics of Blood Cytokine Concentrations in Patients with Bacteremic Infections. **Scand J Infect Dis.** v. 28, n. 4, p. 391–398, 1996.

KUMAR, R.; BHATIA, M.; PAI, K. Role of Cytokines in the Pathogenesis of Visceral Leishmaniasis. **Clin Lab**. v. 63, n. 10, p. 1549-1559, 2017.

LANDIS, J. R.; KOCH, G. G. The measurement of observer agreement for categorical data. **Biometrics**.v. 33, n. 1, p. 159-74, 1977.

LEE, S. A.; YANG, C. A smartphone-based chip-scale microscope using ambient illumination. **Lab Chip**. v. 14, n. 16, p. 3056–3063, 2014

LEE, Y. J. et al. IL-6 induced proliferation and cytotoxic activity of CD8+ T cells is elevated by SUMO2 over expression. **Arch Pharm Res**. v. 39, n. 5, p. 705–712, 2016.

LEUVERING, J. H. et al. Sol particle immunoassay (SPIA). **J Immunoassay**. v. 1, n. 1, p. 77-91, 1980.

LIEW, F.Y.; O'DONNELL, C. A. Immunology of leishmaniasis. **Adv Parasitol**.v. 32, p. 161-259, 1993.

LIMA, S. S. **INF $\gamma$ , IL-6, CXCL-8 e IL-10 são marcadores precoces da evolução da leishmaniose visceral**. 2015. 149f. Dissertação (Mestrado em Ciências e Saúde). Universidade Federal do Piauí, Teresina. 2015.

LIN, Y.Y. et al. A nanoparticle label/immunochromatographic electrochemical biosensor for rapid and sensitive detection of prostate-specific antigen. **Biosens. Bioelecton**. v. 23, n. 11, p. 1659–1665, 2008.

LIN, Z. et al. Development of an immunochromatographic lateral flow device for rapid detection of Helicobacter pylori stool antigen. **Clin Biochem**. v. 48, n. 18, p. 1298-303, 2015.

LIPPITZ, B. E. Cytokine patterns in patients with cancer: A systematic review. **Lancet Oncol**. v. 14, n. 6, p. 218–28, 2013.

LIPPITZ, B. E.; HARRIS, R. A. Cytokine patterns in cancer patients: A review of the correlation between interleukin 6 and prognosis. **Oncoimmunology**. v. 5, n. 5, e. 1093722, 2016.

LITMAN, D. J.; HANLON, T. M.; ULLMAN, E. F. Enzyme channeling immunoassay: a new homogeneous enzyme immunoassay technique. **Anal Biochem**. v. 106, n. 1, p. 223–229, 1980.

LIU, B.H. et al. Development of a monoclonal antibody against ochratoxin A and its application in enzyme-linked immunosorbent assay and gold nanoparticle immunochromatographic strip. **Anal Chem.** v. 80, n. 18, p. 7029-7035, 2008.

LIU, C. et al. Immunochromatography detection of human lactoferrin protein in milk from transgenic cattle. **J Aoac Int.** v. 96, n. 1, p. 16-20, 2013.

LIU, D.; UZONNA, J. E. The early interaction of Leishmania with macrophages and dendritic cells and its influence on the host immune response. **Front Cell Infect Microbiol.** v. 2, n. 6, p. 83-90, 2012.

LIU, G. et al. Aptamer-nanoparticle strip biosensor for sensitive detection of cancer cells. **Anal. Chem.** v. 81, p. 10013-10018, 2009.

LIU, Y.; MOU, S. Ion chromatographic determination of some anions and alkaline cations in liquid crystal materials after ultraviolet irradiation. **Talanta.** v. 60, n. 6, p. 1205-13, 2003.

LONNBERG, M.; CARLSSON, J. Quantitative detection in the attomole range for immunochromatographic tests by means of a flatbed scanner. **Anal Biochem.** v. 293, n. 2, p. 224-231, 2001.

LOU, S. et al. One-step competitive immunochromatographic assay for semiquantitative determination of lipoprotein(a) in plasma. **Clin Chem.** v. 39, n. 4, p. 619-624, 1993.

LUKES, J. et al. Evolutionary and geographical history of the Leishmania donovani complex with a revision of current taxonomy. **Proc Natl Acad Sci.** v. 104, n. 22, p. 9375-80. 2007.

MABEY, D. et al. Diagnostics for the developing world. **Nat Ver Microbiol.**, v. 2, p. 231-240, 2004.

MAFFIA, P. C. et al. Neutrophil elastase converts human immature dendritic cells into transforming growth factor-beta1-secreting cells and reduces allostimulatory ability. **Am J Pathol.** v. 171, n. 3, p. 928-37, 2007.

MAHER, D. et al. Priorities for developing countries in the global response to non-communicable diseases. **Glob. Health.** v. 8, 2012.

MARKIKOU-OUNI, W.; BEN ACHOUR-CHENIK, Y.; MEDDEB-GARNAOUI, A. Effects of Leishmania major clones showing different levels of virulence on infectivity,

differentiation and maturation of human dendritic cells. **Clin Exp Immunol.** v. 169, n. 3, p. 273–80, 2012.

MAURÍCIO, I. L.; STOHARD, J. R.; MILES, M. A. The strange case of *Leishmania chagasi*. **Parasitol Today.** v. 16, n. 5, p. 188-89, 2000.

MCDOWELL, M. A.; SACKS, D. L. Inhibition of host cell signal transduction by *Leishmania*: observations relevant to the selective impairment of IL-12 responses. **Curr Opin Microbiol.** v. 2, n. 4, p. 438-43, 1999.

MEDLEY, C. D. et al. Gold nanoparticle-based colorimetric assay for the direct detection of cancerous cells. **Anal Chem.** v. 80, n. 4, p. 1067-72, 2008.

MILLIPORE, Rapid Lateral Flow Test Strips, Considerations for product development, 2013.

MIRICK, G.R.; BRADT, B.M.; DENARDO, S.J.; DENARDO, G. L. A review of human anti-globulin antibody (HAGA, HAMA, HACA, HAHA) responses to monoclonal antibodies. Not four letter words. **Q J Nucl Med Mol Imaging.** v. 48, p. 251-7, 2004.

MISCH, E. A.; HAWN, T. R. Toll-like receptor polymorphisms and susceptibility to human disease. **Clin Sci.** v. 114, n. 5, p. 347-60, 2008.

MOLD, C. et al. C-reactive protein is protective against *Streptococcus pneumoniae* infection in mice. **J Exp Med.** v. 154, n. 5, p. 1703-8. 1981.

MOLINA, R.; GRADONI, L.; ALVAR, J. HIV and the transmission of *Leishmania*. **Ann Trop Med Parasitol.** v. 97, Suppl. 1, p. 29-45. 2003.

MONTALBÁN, C. et al. Visceral Leishmaniasis (kala-azar) as an opportunistic infection in patients with human immunodeficiency virus in Spain. **Rev Infect Dis.** v.11, p. 655-660. 1989.

MORADIN, N.; DESCOTEAUX, A. *Leishmania* promastigotes: building a safe niche within macrophages. **Front Cell Infect Microbiol.** v. 2, p. 121, 2012.

MORENO, J. et al. HIV-*Leishmania infantum* co-infection: humoral and cellular immune responses to the parasite after chemotherapy. **Trans R Soc Trop Med Hyg.** v. 94, n. 3, p. 328-32. 2000.

MORTENSEN, R. F.; ZHONG, W. Regulation of phagocytic leukocyte activities by C-reactive protein. **J Leukocyte Biol.** v. 67, p. 495–500, 2000.

MOBITHINKING. Global mobile statistics 2014. Part A: Mobile subscribers; handset Market share; mobile operators. 2014. Disponível em: <http://mobiforge.com/research-analysis/global-mobile-statistics-2014-part-a-mobile-subscribers-handset-market-share-mobile-operators>).

MROCZKO, B. et al. Diagnostic usefulness of serum interleukin 6 (IL-6) and C-reactive protein (CRP) in the differentiation between pancreatic cancer and chronic pancreatitis. **J Clin Lab Anal.** v. 24, p. 256–261, 2010.

MUELLER, Y. et al. Risk factors for in-hospital mortality of visceral leishmaniasis patients in eastern Uganda. **Trop Med Int Health.** v. 14, n. 8, p. 910–17. 2009.

MUIGAI, R. et al. Jejunal function and pathology in visceral leishmaniasis. **Lancet.** v. 2, p. 472-479. 1983.

MURUGAIYAN, G. et al. Differential CD40/CD40L expression results in counteracting antitumor immune responses. **J Immunol.** v.178, n. 4, p. 2047-55, 2007.

NAGATANI, N. et al. Gold nanoparticle-based novel enhancement method for the development of highly sensitive immunochromatographic test strips. **Sci Technol Adv Mat.** v.7, n. 3, p. 270-275, 2006.

NAKAMURA, H. KARUBE, I. Current research activity in biosensors. **Anal Bioanal Chem.** v. 377, p. 446-468, 2003.

NAPOLITANO, L. M. et al. Sepsis 2018: Definitions and Guideline Changes. **Surg Infect (Larchmt).** v. 9, n. 2, p. 117-125, 2018.

NAVANI, N.K.; LI, Y. Nucleic acid aptamers and enzymes as sensors. **Curr Opin Chem Biol.** v. 10, p. 272–281, 2006.

NICOLINI, A. M.; FRONCZEK, C. F.; YOON, J. Y. Droplet-based immunoassay on a sticky nanofibrous surface for multiplexed and dual detection of bacteria using smartphones. **Biosens Bioelectron.** v. 67, n. 10, p. 560–569, 2015.

NIELSEN, K. et al. Development of a Lateral Flow Assay for Rapid Detection of Bovine Antibody to *Anaplasma marginale*. **J Immunoassay Immunochem.** v. 29, p. 10-18, 2008.

NOGUEIRA, A. C.; MONTEIRO, T.; ESCOBAR V.J. P. Gestión para la vigilancia entomológica y control de la transmisión de leishmaniasis. **Retrieved from**, 2013.

NYLÉN, S. et al. Splenic accumulation of IL-10 mRNA in T cells distinct from CD4+CD25+ (Foxp3) regulatory T cells in human visceral leishmaniasis. **J Exp Med.** v. 204, n. 4, p. 805-17, 2007.

NYLÉN, S.; SACKS, D. Interleukin-10 and the pathogenesis of human visceral leishmaniasis. **Trends Immunol.** v. 28, n. 9, p. 378-84, 2007.

NYSTROM, T. C- reactive protein: A marker or player? **Clin Sci.** v. 113, p. 79–81, 2007.

OH, Y. K. et al. A three-line lateral flow assay strip for the measurement of C-reactive protein covering a broad physiological concentration range in human sera. **Biosens Bioelectron.** v. 61, p. 285–289, 2014.

OHLIN, M. et al. Light chain shuffling of a high affinity antibody results in a drift in epitope recognition. **Mol Immunol.** v.33, n. 1, p. 47-56, 1996.

O'KEEFFE, M. et al. Preliminary evaluation of a lateral flow immunoassay device for screening urine samples for the presence of sulphamethazine. **J Immunol Methods.** v. 278, n. 1-2, p. 117–126, 2003.

OKU, Y. et al. Development of oligonucleotide lateral-flow immunoassay for multi-parameter detection. **J Immunol Methods.** v. 258, n. 1-2, p. 73–84, 2001.

OLIVIER, M.; GREGORY, D. J.; FORGET, G. Subversion mechanisms by which leishmania parasites can escape the host immune response: a signaling point of view. **Clin Microbiol Rev.** v. 18, n. 2, p. 293-305, 2005.

OLIVEIRA, F. et al. Sand flies, *Leishmania*, and transcriptome-borne solutions. **Parasitol Int.** v. 58, n. 1, p. 1–5, 2009.

OMIDFAR, K. et al. Colloidal nanogold-based immunochromatographic strip test for the detection of digoxin toxicity **Appl Biochem Biotechnol.** v. 160, n. 3, p. 843–855, 2010.

OMIDFAR, K.; KHORSAND, F.; DARZIANI AZIZI, M. New analytical applications of gold nanoparticles as label in antibody based sensors. **Biosens Bioelectron.** v. 43, p. 336-347, 2013.

OMS - Organização Mundial de Saúde. **Leishmaniasis parasitic disease.** Disponível em:< [http://www.who.int/leishmaniasis/epidemic/response\\_more/en/index.html](http://www.who.int/leishmaniasis/epidemic/response_more/en/index.html)>. Acesso em mar. 2013.

OHSHIMA, S. et al. Interleukin-6 plays a key role in the development of antigen-induced arthritis. **Proc Natl Acad Sci.** v. 95, p. 8222–8226, 1998.

PANICHI, V. et al. Interleukin-6 is a stronger predictor of total and cardiovascular mortality than C-reactive protein in haemodialysis patients. **Nephrol Dial Transplant.** v. 19, p.1154–1160, 2004.

PAEK, S.H. et al. Passive micromixer using by convection and surface tension effects with air-liquid interface. **Biochip J.** v. 1, n. 4, p. 1–16, 2007.

PARKIN, J.; COHEN B. An overview of the immune system. **Lancet.** v. 357, n. 9270, p. 1777-89, 2001.

PAROLO, C. et al. Simple paper architecture modifications lead to enhanced sensitivity in nanoparticle based lateral flow immunoassays. **Lab Chip.** v. 13, p. 386–390, 2013.

PAROLO, C.; DE LA ESCOSURA-MUÑIZ, A.; MERKOÇI, A. Enhanced lateral flow immunoassay using gold nanoparticles loaded with enzymes. **Biosens Bioelectron.** v. 40, n. 1, p. 412–6, 2013.

PAROLO, C.; MERKOCI, A. Paper-based nanobiosensors for diagnostics. **Chem Soc Rev.** v. 42, n. 2, p. 450–457, 2013.

PEARSON, R. D.; SOUSA, A. Q. Clinical spectrum of Leishmaniasis. **Clin Infect Dis.** v. 22, p.1–13, 1996.

PEELING, R.W. et al. Why do we need quality-assured diagnostic tests for sexually transmitted infections? **Nat Rev Microbiol.** v. 4, Suppl. 7, 2006a.

PEELING R. W. et al. Rapid tests for sexually transmitted infections (STIs): the way forward. **Sex Transm Infect.** v. 82, Suppl 5, p. v1–v6, 2006b.

PEELING, R. W.; MABEY, D. Point-of-care tests for diagnosing infections in the developing world. **Clin Microbiol Infect.** v. 16, p. 1062–1069, 2010.

PEPYS, M. B.; BALTZ, M. L. Acute phase proteins with special reference to C-reactive protein and related proteins (pentaxins) and serum amyloid A protein. **Adv Immunol.** v. 34, p. 141-212, 1983.

PEPYS, M. B.; HIRSCHFIELD, M. G. C-reactive protein: A critical update. **J Clin Invest.**, v. 111, p. 1805–12, 2003.

PERUHYPE-MAGALHÃES, V. et al. Mixed inflammatory/regulatory cytokine profile marked by simultaneous raise of interferon-gamma and interleukin-10 and low frequency of tumour necrosis factor-alpha(+) monocytes are hallmarks of active human visceral Leishmaniasis due to *Leishmania chagasi* infection. **Clin Exp Immunol.** v. 146, n. 1, p. 124–32, 2006.

PETERS, N.; SACKS, D. Immune privilege in sites of chronic infection: *Leishmania* and regulatory T cells. **Immunol Rev.** v. 213, p. 159-79, 2006.

PINTADO, V. et al. Visceral leishmaniasis in human immunodeficiency virus (HIV)-infected and non-HIV-infected patients. A comparative study. **Medicine (Baltimore).** v. 80, n. 1, p. 54–73. 2001.

PINTADO, V.; LÓPES-VÉLEZ, R. HIV-associated visceral leishmaniasis. **Clin Microb Infect.** v. 7, n.13, p.291-300. 2000.

PITTA, M. G. et al. IL-17 and IL-22 are associated with protection against human kala azar caused by *Leishmania donovani*. **J Clin Invest.** v. 119, n. 8, p. 2379-87. 2009.

POSTHUMA-TRUMPIE, G. A.; KORF, J.; VAN AMERONGEN, A. Lateral flow (immuno)assay: Its strengths, weaknesses, opportunities and threats. A literature survey. **Anal Bioanal Chem.** v. 393, n. 2, p. 569–582, 2009.

QUEIROZ, M. J. A.; ALVES, J. G. B.; CORREIA, J. B. Leishmaniose visceral: características clínico-epidemiológicas em crianças de área endêmica. **J Pediatr.** v. 80, p. 141-146, 2004.

QUESADA-GONZÁLEZ, D.; MERKOÇI, A. Nanoparticle-based lateral flow biosensors. **Biosens Bioelectron.** v. 73, p. 47–63, 2015.

RAMAMOORTHY, R.D. et al. A review of C-reactive protein: A diagnostic indicator in periodontal medicine. **J Pharm Bioallied Sci.** (Suppl 2), p. 422-6, 2012.

RAMOS, P. K. et al. Serum Cytokine Responses over the Entire Clinical-Immunological Spectrum of Human Leishmania (L.) infantum chagasi Infection. **Biomed Res Int.** 2016:6937980, doi: 10.1155/2016/6937980, 2016.

RANDAU, T. M. et al. Interleukin-6 in serum and in synovial fluid enhances the differentiation between periprosthetic joint infection and aseptic loosening. **PLoS ONE**, v. 9, n. 2, p. 1–6, 2014.

RASBAND, M. N. Composition, assembly, and maintenance of excitable membrane domains in myelinated axons. **Semin Cell Dev Biol.** v. 22, n. 2, p. 178-84, 2011.

RAYMOND, F. et al. Genome sequencing of the lizard parasite Leishmania tarentolae reveals loss of genes associated to the intracellular stage of human pathogenic species. **Nucleic Acids Res.** v. 40, n. 3, p. 1131–47, 2012.

RECHBERGER, G.N. et al. Quantitative analysis of clindamycin in human plasma by liquid chromatography/electrospray ionisation tandem mass spectrometry using d1-N-ethylclindamycin as internal standard. **Rapid Commun Mass Spectrom.** v. 17, n. 2, p. 135-9, 2003.

RIDKER, P. M. et al. C-Reactive protein and other markers of inflammation in the prediction of cardiovascular disease in women. **N Engl J Med.** v.342, p. 836–43, 2003.

RIEDEL, F. et al. Serum levels of interleukin-6 in patients with primary head and neck squamous cell carcinoma. **Anticancer Res.** v. 25, n. 4, p. 2761–2766, 2005.

RIDLEY R.G. Diagnostics take centre stage. **Nat Rev Microbiol.** v. 4, (Suppl. 1), 2006.

ROSE-JOHN, S.; HEINRICH, P.C. Soluble receptors for cytokines and growth factors: generation and biological function. **Biochem J.** v. 300, p. 281–290, 1994.

ROY, S. et al. A Defective Oxidative Burst and Impaired Antigen Presentation are Hallmarks of Human Visceral Leishmaniasis. **J Clin Immunol.** v. 35, n. 1, p. 56–67, 2015.

ROZAND, C. Paper-based analytical devices for point-of-care infectious disease testing. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis.** v. 33, p. 147–156, 2014.

SACKS, D.; KAMHAWI, S. Molecular aspects of parasite-vector and vector-host interactions in leishmaniasis. **Annu Ver Microbiol.** v. 55, n. 3, p.453-383, 2001.

SACKS, D.; NOBEN-TRAUTH, N. The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. **Nat Rev Immunol.** v.2, n. 11, p. 845-58, 2002.

SACKS, D.; SHER, A. Evasion of innate immunity by parasitic protozoa. **Nat Immunol.** v. 3, n. 11, p. 1041-7. 2002.

SAHA, S. et al. Immune responses in kala-azar. **Indian J Med Res.** v.123, n. 3, p. 245-66. 2006.

SAJID, M.; KAWDE, A. N.; DAUD, M. Designs, formats and applications of lateral flow assay: A literature review. **Chem Soc.** v. 19, n. 6, p. 689-905, 2014.

SALLES, M. O. et al. Explosive colorimetric discrimination using a smartphone, paper device and chemometrical approach. **Anal Meth.** v. 6, n. 7, p. 2047-2052, 2014.

SAMOILOVA, A. B. et al. IL-6-deficient mice are resistant to experimental autoimmune encephalomyelitis: roles of IL-6 in the activation and differentiation of autoreactive T cells. **J Immunol.** v. 161, n. 12, p. 6480-6, 1998.

SAMPAIO, M. J. A. Q. et al. Risk factors for death in children with visceral leishmaniasis. **PLoS Negl Trop Dis.** v. 4, n. 11, p. 877, 2010.

SANG, S. et al. Progress of new label-free techniques for biosensors: a review. **Crit. Rev. Biotechnol.** v. 36, n. 3, p. 465-81, 2016.

SANTOS-OLIVEIRA, J. R. et al. Evidence that lipopolisaccharide may contribute to the cytokine storm and cellular activation in patients with visceral leishmaniasis. **PLoS Negl Trop Dis.** v. 5, n. 7, e1198, 2011.

SAPTARSHI, S. R.; DUSCHL, A.; LOPATA, A.L. Interaction of nanoparticles with proteins: relation to bio-reactivity of the nanoparticle. **J. Nanobiotechnology.** v. 11, n. 1, p. 26, 2013.

SARKARI, B. et al. Visceral Leishmaniasis in Southwestern Iran: A Retrospective Clinico-Hematological Analysis of 380 Consecutive Hospitalized Cases (1999–2014). **Plos One.** v. 11, n. 3, p. e0150406, 2016.

SCHETT, G. et al. How cytokine networks fuel inflammation: Toward a cytokine-based disease taxonomy. **Nat Med.** v.19, n. 7, p. 822-4, 2013.

SCREPANTI, I. et al. Inactivation of the IL6-gene prevents development of multicentric Castleman's disease in C/EBP $\beta$ -deficient mice. **J Exp Med.** v. 184, p. 1561–1566, 1996.

SEAMAN, J. et al. Epidemic visceral leishmaniasis in southern Sudan: treatment of severely debilitated patients under wartime conditions and with limited resources. **Ann Intern Med.** v. 124, n. 7, p. 664–72. 1996.

SELA-CULANG, I; KUNIK, V.; OFRAN, Y. The Structural Basis of Antibody-Antigen Recognition. **Front Immunol.**, v. 4, n. 302, 2013.

SELVAPANDIYAN, A. et al. A novel semi-quantitative fluorescence-based multiplex polymerase chain reaction assay for rapid simultaneous detection of bacterial and parasitic pathogens from blood. **J Mol Diagn.** v. 7, n. 2, p. 268-75. 2005.

SENE, I.S. Avaliação de fatores clínicos de pacientes com leishmaniose visceral e sua relação com a quantidade de parasitos e citocinas. 2013. 124f. Dissertação (Mestrado em Ciências e Saúde). Universidade Federal do Piauí, Teresina. 2013.

SHARMA, U.; SINGH, S. Insect vectors of *Leishmania*: distribution, physiology and their control. **J Vector Borne Dis.** v. 45, n. 1, p. 255–72, 2008.

SHARMA, S. et al. Point-of-Care Diagnostics in Low Resource Settings: Present Status and Future Role of Microfluidics. **Biosensors (Basel).** v. 5, n. 3, p. 577-601, 2015.

SHEN, L.; HAGEN, J. A.; PAPAUTSKY, I. Point-of-care colorimetric detection with a smartphone. **LabChip.** v. 12, n. 21, p. 4240–4243, 2012.

SINGER, J. M.; PLOTZ, C. M. The latex fixation test I. **Amer J of Medicine,** v. 21, n. 6, p. 888–892, 1956.

SINGH, U. K. et al. Prognostic value of serum C-reactive protein in kala-azar. **J Trop Pediatr.** v. 45, n. 4, p. 226-8, 1999.

SILVA, J. S. et al. Low CXCL13 expression, splenic lymphoid tissue atrophy and germinal center disruption in severe canine visceral leishmaniasis. **PLoS One.** v. 7, n. 1, e29103, 2012.

SKANDARAJAH, A. et al. Quantitative imaging with a mobile phone microscope. **PloS One**. v. 9, n. 5, p. e96906, 2014.

SKIRECKI, T. et al. Sepsis immunopathology: perspectives of monitoring and modulation of the immune disturbances. **Arch Immunol Ther Exp (Warsz)**. v. 60, n. 2, p. 123-35, 2012.

SLADE, G. D. et al. Relationship between periodontal disease and C-Reactive Protein among adults in the atherosclerosis risk in communities study. **Arch Intern Med**. v.163, p. 172–9, 2003.

SODERLIND, E.; OHLIN, M.; CARLSSON, R. Complementarity-determining region (CDR) implantation: a theme of recombination. **Immunotechnology**. v. 4, p. 279–85, 1999.

SONG, S. et al. Functional nanoprobe for ultrasensitive detection of biomolecules. **Chem Soc Rev**. v. 39, n. 11, p. 4234, 2010.

SPERLING, A. R.; PARAK, W. J. Surface modification, functionalization and bioconjugation of colloidal inorganic nanoparticles. **Philos Trans R Soc A Math Phys Eng Sci**. v. 368, n. 1915, p. 1333–1383, 2010.

STOUT, R. D.; SUTTLES, J. The many roles of CD40 in cell-mediated inflammatory responses. **Immunol Today**. v. 17, n. 10, p. 487-92. 1996.

SZALAI, A. J.; BRILES, D. E.; VOLANAKIS, J. E. Role of complement in C-reactive protein-mediated protection of mice from *Streptococcus pneumoniae*. **Infect Immun**. v. 64, p. 4850–4853, 1996.

TANAKA, R. et al. A novel enhancement assay for immunochromatographic test strips using gold nanoparticles. **Anal Bioanal Chem**. v. 385, p. 1414-1420, 2006.

TILLET, W. S.; FRANCIS, JR. T. Serological reactions in pneumonia with a non-protein somatic fraction of pneumococcus. **J Exp Med**. v. 52, n. 4, p. 561–571, 1930.

TOWNSEND, M. B. et al, Evaluation of the Tetracore Orthopox BioThreat\_ antigen detection assay using laboratory grown orthopoxviruses and rash illness clinical specimens. **J Virol Methods**. v. 187, p. 37–42, 2013.

TRIKHA, M. et al. Targeted anti-interleukin-6 monoclonal antibody therapy for cancer: a review of the rationale and clinical evidence. **Clin Cancer Res**. v. 9, n. 13, p. 4653-6, 2003.

TRINCHIERI, G. Interleukin-10 production by effector T cells: Th1 cells show self control. **J Exp Med.** v. 204, n. 2, p. 239–243, 2007.

TSENG, D. et al. Lens free microscopy on a cellphone. **LabChip.** v. 10, n. 14, p. 1787–1792, 2010.

TULEK, B. et al. Serum C-reactive protein and procalcitonin levels in non-small cell lung cancer patients. **Contemp Oncol.** v. 17, n. 1, p. 68-72, 2013.

TURKEVICH, J.; KIM, G. Palladium: Preparation and catalytic properties of particles of uniform size. **Science.** v. 169, n. 3948, p. 873–879, 1970.

VAN DER POLL, T.; ZIJLSTRA, E. E.; MEVISSSEN, M. Interleukin 6 during active visceral leishmaniasis and after treatment. **Clin Immunol Immunopathol.** v. 77, n. 1, p. 111–114, 1995.

VERHEIJEN, R. et al. Development of a one step strip test for the detection of sulfadimidine residues. **Analyst.** v. 123, n. 12, p. 2437-41, 1998.

VIEIRA, E. L. M. et al. Immunoregulatory profile of monocytes from cutaneous leishmaniasis patients and association with lesion size. **Parasite immunol.** v. 35, n. 2, p. 65–72, 2013.

VON LODE, P. Point-of-care immunotesting: approaching the analytical performance of central laboratory methods. **Clin Biochem.** v. 38, n. 7, p. 591–606, 2005.

WAAGE, A. et al. The complex pattern of cytokines in serum from patients with meningococcal septic shock. Association between interleukin 6, interleukin 1, and fatal outcome. **J Exp Med.** v. 169, p. 333–338, 1989.

WANG, C. W.; KAPOOR, R. Dissociation constant measurement using combination tapered fiber-optic biosensor (CTFOB) dip-probes. **Proc SPIE Int Soc Opt Eng.** v. 33, n. 4, p. 395–401, 2010.

WANG, S. et al. Rapid Determination of Fumonisin B<sub>1</sub> in Food Samples by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay and Colloidal Gold Immunoassay. **J Agric Food Chem.** v. 54, n. 7, p. 2491–2495, 2006.

WARNER, E.A.; MOLDAWER, L.L. Using innate immunity to characterize the host response to microbial invasion in severe sepsis. **Future Microbiol.** v. 3, n. 2, p. 177-89. 2008.

WARSINKE, A. Point-of-care testing of proteins. **Anal Bioanal Chem.** v. 393, n. 5, p. 1393–1405, 2009.

WASUNNA, K. M. et al. Acute phase protein concentrations predict parasite clearance rate during therapy for visceral leishmaniasis. **Trans R Soc Trop Med Hyg.** v. 89, n. 6, p. 678-81, 1995.

WEI, L. H. et al. The anti-apoptotic role of interleukin-6 in human cervical cancer is mediated by up-regulation of Mcl-1 through a PI 3-K/Akt pathway. **Oncogene.** v. 20, n. 41, p. 5799–809, 2001.

WERNECK, G. L. et al. Prognostic factors for death from visceral leishmaniasis in Teresina, Brazil. **Infection.** v. 31, n. 3, p. 174-77. 2003.

WHO and Special Programme for Research & Training in Tropical Diseases (TDR). Innovations for Health, Researches that make a difference, KETTLER 2010.

WHO, 2015. Disponível em: <<http://www.who.int/leishmaniasis/en/>>. ; Acesso em 06 fev. 2018.

WILLETS J.; VAN DUYNE, P. Localized Surface Plasmon Resonance Spectroscopy and Sensing, **Annu Rev Phys Chem.** v. 58, n. 1, p. 267–297, 2007.

WILLIAM, E. P. Fundamental Immunology. LWW, 7<sup>a</sup> ed. 1828p. 2013.

WILLIAMSON D. Research finds periodontal disease, body mass index jointly associated with heart disease protein marker. **UNC News Services.** n. 298, 2003.

WILSON, M. E.; JERONIMO, S. M. D.; PEARSON, R. D. Immunopathogenesis of infection with the visceralizing Leishmania species. **Microl Pathol.** v. 38, p. 147-160. 2005.

WONG, H. L. et al. Reproducibility and correlations of multiplex cytokine levels in asymptomatic persons. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.** v. 17, n. 12, p. 3450-6. 2008.

WORLD, 1993. Disponível em: <<https://www.ufrgs.br/bioetica/cioms.htm>> Diretrizes éticas internacionais para pesquisas envolvendo seres humanos, 1993.

WU, C. S. et al. Engineering molecular beacons for intracellular imaging. **Int J.Mol Imaging**. p. 501–579, 2012.

XIE, H. L.; MA, A.; LIU, L. Q. Development and validation of an immunochromatographic assay for rapid multi-residues detection of cepheids in milk. **Anal Chim Acta**. v.634, n. 1, p. 129-133, 2009.

XU, X.; MIRKIN, A. C. A gold-nanoparticle-based real-time colorimetric screening method for endonuclease activity and inhibition. **Angew Chem Int**. v. 46, n. 19, p. 3468-70, 2007.

XU, Y. et al. Fluorescent probe-based lateral flow assay for multiplex nucleic acid detection, **Anal. Chem**. v. 86, p. 5611–5614, 2014.

YAGER, P. et al. Microfluidic diagnostic technologies for global public health. **Nature**, v. 442, n. 7101, p. 412–418, 2006.

YASUKAWA, K. et al. Structure and expression of human B cell stimulatory factor-2 (BSF-2/IL-6) gene. **EMBO J**. v. 6, n.10, p. 939-45, 1987.

YETISEN, A. K.; AKRAM, M. S.; LOWE, C. R. Paper-based microfluidic point-of-care diagnostic devices. **Lab Chip**. v.13, p. 2210–2251, 2013.

YU, J. et al. Oxygen Sensing Based on the Yellowing of Newspaper. **ACS Sens**. v.3, n. 1, p. 160-166, 2018.

YUDKIN, J.S. et al. Inflammation, obesity, stress and coronary heart disease: is interleukin-6 the link? **Atherosclerosis**. v. 148, n. 2, p. 209-14, 2000.

ZACARIAS, D. A. et al. Causes and consequences of higher *Leishmania infantum* burden in patients with kala-azar: a study of 625 patients. **Trop Med Int Health**. v.22, n. 6, p. 679-687, 2017.

ZAMBSON, J. J. et al. Microbiology of Periodontal Disease. In: Slots J, Taubman JE, editors. USA: St. Louis; p. 32–40, 1985.

ZANGHERI, M. et al. A simple and compact smartphone accessory for quantitative chemiluminescence-based lateral flow immunoassay for salivary cortisol detection, **Biosens.Bioelectron** .v. 64, p. 63–68, 2015.

ZENG, N. et al. Inference of nonlinear state-space models for sandwich-type lateral flow immunoassay using extended Kalman filtering, IEEE. **Trans Biomed Eng.** v. 58, p. 1959–1966, 2011.

ZENG, N. et al. Identification of nonlinear lateral flow immunoassay state-space models via particle filter approach, IEEE. **Trans Nanotechnol.** v. 11, p. 321–327, 2012a.

ZENG, N. et al. A hybrid EKF and switching PSO algorithm for joint state and parameter estimation of lateral flow immunoassay models, IEEE/ACM **Trans Comput Biol Bioinform.** v. 9, p. 321–329, 2012b.

ZENG, N. et al. A novel switching local evolutionary PSO for quantitative analysis of lateral flow immunoassay. **Expert Syst Appl.** v. 41, p. 1708–1715, 2014.

ZHANG, D. et al. Smartphone-based portable biosensing system using impedance measurement with printed electrodes for 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) detection. **Biosens Bioelectron.** v. 15, n. 70, p. 81-8, 2015.

ZHANG, D.; LIU, Q. Biosensors and bioelectronics on smartphone for portable biochemical detection. **Biosens Bioelectron.** v. 75, p. 273–284, 2016.

ZHANG, G.P. et al. Development and evaluation of an immunochromatographic strip for trichinellosis detection. **Vet Parasitol.** v.137, n. 3-4, p. 286–293, 2006.

ZHOU, Q.; SON, K.; LIU, Y.; REVZIN, A. Biosensors for Cell Analysis. **Annu Rev Biomed Eng.** v.17, p. 165-90, 2015.

ZHU, J. et al. Evaluation of a modified lateral flow immunoassay for detection of high-sensitivity cardiac troponin I and myoglobin. **Biosens Bioelectron.** v. 42 p. 522–525, 2013.

ZHU, Y. et al. Development of a rapid, simple dipstick dye immunoassay for schistosomiasis diagnosis. **J Immunol Methods.** v. 266, n. 1-2, p. 1–5, 2002.

**APÊNDICE**

APÊNDICE 1: Parecer do comitê de Ética e Pesquisa**Equipe Plataforma Brasil**

02/07/15

EB

Para: Ingridi De Souza Sene

[Detalhes](#)

Sr. (a) Pesquisador (a),

O projeto DETECÇÃO RÁPIDA DA  
CITOCINA IL-6 PARA IDENTIFICAÇÃO DA  
LV GRAVE com número CAAE  
44037015.3.0000.5214, tem data de  
início prevista para 13/04/2015.

Atenciosamente,

Plataforma Brasil

[www.saude.gov.br/plataformabrasil](http://www.saude.gov.br/plataformabrasil)[plataformabrasil@saude.gov.br](mailto:plataformabrasil@saude.gov.br)

## APÊNDICE 2: Declaração de submissão da patente



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO**  
**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ**  
**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO**  
**NÚCLEO DE INOVAÇÃO E TRANSFERÊNCIA DE TECNOLOGIA**  
*Campus Universitário Ministro Petrônio Portela, Setor de Convivência L09 e L10*  
*Bairro Ininga CEP: 64049-550 - Teresina-PI Fone/Fax (86)3237-1638*

### DECLARAÇÃO

Requerente: INGRID DE SOUZA SENE. CPF: 268.119.538-10

Título do Projeto: **“SENSOR DE FLUXO LATERAL PARA DETECÇÃO DE INTERLEUCINAS”**

Data de Entrada no NINTEC: 11/04/2017.

O Núcleo de Inovação e Transferência de Tecnologia – NINTEC, órgão à Universidade Federal do Piauí, através deste instrumento, declara para as finalidades de direito, a pedido do interessado, que se encontra em nosso poder solicitação para depósito de pedido de PATENTE de autoria do(a) Requerente supra nominado(a) e seu respectivo título, também cima descrito, o(a) qual está em fase de análise dos requisitos necessários à sua formalização junto ao INPI – Instituto Nacional de Propriedade Industrial.

Informamos ainda que para a consecução da postulação pretendida, o objeto deste pleito deve necessariamente atender às seguintes fases:

- a) pré-análise à patenteabilidade da criação;
- b) busca de anterioridade para verificação do estado da técnica;
- c) envio do resultado da busca de anterioridade, juntamente com cópias de pedido já requerido no Brasil e em outros países, bem como orientações para a redação do pedido de patente (AN 127/1997 – INPI);
- d) solicitação de pagamento das taxas de depósito e abertura de processo no Protocolo Geral para depósito de pedido;
- e) apreciação e assinatura da Reitoria da UFPI.
- f) encaminhamento da documentação ao INPI para depósito.

Salientamos ainda que, para cada fase acima descrita, é necessário tempo hábil para as respostas, a fim de cumprir com fidelidade e segurança a pretensão perquerida.

Por ser verdade, firmo a presente.

Teresina (PI), 15 de maio de 2017.

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Maria Rita de Moraes Chaves Santos  
 Coordenadora do Núcleo de Inovação e Transferência de Tecnologia da UFPI

### APÊNDICE 3: Patente

#### SENSOR DE FLUXO LATERAL PARA DETECÇÃO DE INTERLEUCINAS

As interleucinas são proteínas envolvidas na resposta imune inata frente a infecções, inflamações e, tradicionalmente, são identificadas e quantificadas por métodos caros e trabalhosos inviabilizando a utilização na rotina diagnóstica. Os ensaios de fluxo lateral ou teste de tira, já vem sendo utilizados há algumas décadas e os mesmo são considerados testes rápido. O invento, refere-se a sensor de fluxo lateral para detecção quantitativa de interleucinas utilizando nanopartículas de ouro, e marcação pontual na linha de teste para visualização sensor de fluxo lateral para detecção quantitativa de interleucinas utilizando nanopartículas de ouro, e marcação pontual na linha de teste para visualização óptica. O sistema é portátil, sensível, específico, seletivo, prático, rápido de fácil reprodutibilidade e de baixo custo para produção.

#### REIVINDICAÇÕES

1. **Sensor de fluxo lateral para detecção de interleucinas** caracterizado por detectar e mensurar interleucinas utilizando em sua arquitetura nanomateriais e disposição pontual na linha de teste para visualização óptica.
2. **Sensor de fluxo lateral para detecção de interleucinas** de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por ser um teste de tira com montagem em papel e/ou membranas flexíveis de fontes variáveis.
3. **Sensor de fluxo lateral para detecção de interleucinas** de acordo com a reivindicação 1 e 2, caracterizado por apresentar como método de revelação a imunocromatografia do tipo quali/quantitativa.
4. **Sensor de fluxo lateral para detecção de interleucinas** caracterizado por utilizar nanopartículas de ouro em seu conjugado como fonte geradora de sinal optico.
5. **Sensor de fluxo lateral para detecção de interleucinas** caracterizado por ser um teste único ou múltiplo, permitindo detecção e quantificação de uma ou mais proteínas simultaneamente.
6. **Sensor de fluxo lateral para detecção de interleucinas** caracterizado por ser um teste rápido, portátil, de fácil reprodutibilidade a um baixo custo, além, de sensível, específico e seletivo.

## APÊNDICE 4: Comprovante de submissão do artigo de prospecção

iG Mail :: [BIOT] Submission Acknowledgement | BSP-BIOT-2017-117



Assunto[BIOT] Submission Acknowledgement | BSP-BIOT-2017-117 DeRecent Patents on Biotechnology <biot@benthamscience.org> ParaDr. Ingridi Souza Sene <ingsene@ig.com.br> Data09/11/2017 21:17

Reference#: BSP-BIOT-2017-117 Submission Title: LATERAL FLOW ASSAY FOR INTERLEUKIN 6: A TECHNOLOGICAL AND SCIENTIFIC PROSPECTION

Dear Dr. Ingridi Souza Sene,

Thank you for your submission to Recent Patents on Biotechnology. It will be sent to the Editor in Chief for his approval, and once this is obtained for peer-reviewing, on the understanding that the manuscript contains original work that has neither been published earlier nor has simultaneously been submitted elsewhere. In case this is not so, please let us know immediately.

Please note that Bentham Science uses **CrossCheck's iThenticate software** to check for similarities between the submitted and already published material to minimise any chances of plagiarism.

Further, as per Bentham Science's **Ethical Guidelines for Publication**, all manuscript are processed with the understanding that all authors and co-authors have reviewed and accordingly approved the manuscript before final submission to avoid any conflicts of interest later. Our ethical policies can be viewed at: <http://benthamscience.com/journal/publishing-ethics.php?journalID=rpbiot#top>.

In case of any doubt or conflict please contact us immediately.

Your manuscript has been assigned to the following Editor/Manager, to whom all correspondence is to be addressed:

Name:Nikolaos Labrou Affiliation:Department of Biotechnology, Laboratory of Enzyme Technology, Agricultural University of Athens Country:Greece Email:lambrou@aua.gr Looking forward to the successful publication of your article.

In case of delay, please feel free to write [info@benthamscience.org](mailto:info@benthamscience.org)

Sincerely, Editorial Office Bentham Science Publishers Recent Patents on Biotechnology  
<http://benthamscience.com/journal/index.php?journalID=rpbiot>

[https://webmail.ig.com.br/?\\_task=mail&\\_action=print&\\_uid=17250&\\_mbox=INBOX](https://webmail.ig.com.br/?_task=mail&_action=print&_uid=17250&_mbox=INBOX)

Página 1 de 1

APÊNDICE 5: Prospecção científica e tecnológica

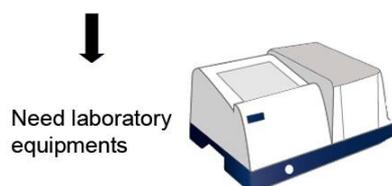
**LATERAL FLOW ASSAY FOR INTERLEUKIN 6: A TECHNOLOGICAL AND SCIENTIFIC PROSPECTION AT 10-YEAR SURVEY**

**Ingridi de Souza Sene<sup>1,2</sup>, Vladimir Costa<sup>2</sup>, Gisele Elias Nunes Pauli<sup>5</sup>, Ivan H. Bechtold<sup>5</sup>,  
Lívio César Cunha Nunes<sup>1,4</sup>, Carla Eiras<sup>1,3</sup>, Carlos Henrique Nery Costa<sup>1,2</sup>**

1. Universidade Federal do Piauí, Teresina - PI, Brasil
2. Instituto de Doenças Tóxicas Natan Portella (IDTNP)
3. Laboratório Interdisciplinar de Materiais Avançados –LIMAV-UFPI
4. Centro de Ciências da Saúde (CCS) – UFPI - Dep. Farmácia
5. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis – SC, Brasil

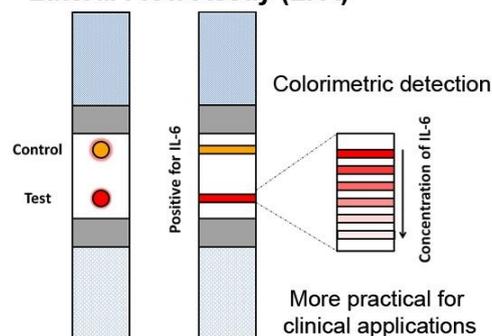
**Main techniques used to measure IL-6:**

- Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA);
- Cytometric bead array (CBA) methods;
- Electrochemical experiments;



**Proposed strategy:**

**Lateral Flow Assay (LFA)**



**Abstract:** *Background:* Interleukin-6 (IL-6) is a multifunctional cytokine that plays a keystone role not only in the immune system but also in numerous biological processes. Elevated IL-6 levels have been observed in many types of cancer and inflammatory diseases. Among the techniques that have been used to quantify IL-6, Lateral Flow Assay (LFA) is one of the most promising. *Objective:* To perform a technological and scientific exploration about the development of LFA for IL-6. *Methods:* This study performed a technological and scientific exploration about the development of LFA for IL-6 detection. The Instituto Nacional de Propriedade Industrial – INPI (Brazil), European Patent Office - Espacenet and the United States Patent and Trademark Office – USPTO were used in technological prospecting, considering all patents relating to LFA for IL-6 detection. For scientific investigation was used the follow periodic data bases: Web of Science, Science Direct, PubMed and Scielo, from 2007 to May 2017. *Results:* There were no patents with the searched keywords and a limited number of scientific articles were found. Therefore, the development of an LFA sensor for detecting IL-6 appears to be innovative with significant biotechnological importance, reaching for a technology transfer to generate economic and industrial growth. *Conclusion:* The development of lateral flow immunosensors for IL-6 is innovative, since we couldn't find patents describing this kind of biosensor. The scientific prospecting reported two lateral flow immunosensors. However, the test for IL-6 is still not done without using some kind of equipment for detection, like the one we propose in perspectives.

**Keywords:** Lateral Flow Assay; IL-6; Diagnosis.

## 1. INTRODUCTION

Immunochromatographic tests also called lateral flow assays have already been used for some decades. These biosensors are considered a technological extension of the agglutination immunoassays tests developed by SINGER and PLOTZ, (1956)[1].

The development of this type of assay has a broad practical application once they are easy to use, the result is immediate or demands only a few minutes, the stability and durability are sustained for a long period of time and in varied climate conditions, besides requiring low development cost. These characteristics make strip tests ideal for home, bedside or field use and do not demand a specialized professional for its interpretation [1-4].

Third World countries, where advanced and costly technologies are not always available to most of the population, are the potential beneficiaries of the development of these simple devices [5].

Currently, biosensors are technologies that assure not only qualitative results but also excellent quantitative ones. Since the advent of the first strips, like pregnancy tests during the 1970's, many materials have been incremented to improve the quality of these sensors. With the development of nanotechnologies, the employment of gold nanoparticles, improve the intensity of the colorimeter signal and the sensitivity and specificity of the tests [6-10].

The assays that utilize enzymes, lateral flow immunoassays, are quick protein recognition strip tests applied to detect pathogens, toxins, harmful substances among other monitoring actions [11-14].

Developing a lateral flow immunoassay for the detection of interleukin 6 (IL-6) has been our choice, since there are countless types of electrochemical sensors reported, with excellent sensitivity and specificity but that still demand costly equipment and a competent professional to interpret results [15-22].

IL-6 has been characterized for its capacity to promote the expansion of T cell population and its differentiation to B cells [23, 24]. Therefore, this cytokine is considered pleiotropic, for presenting a similar action to hormones and for being produced in almost every cell of the immune system [25]. Recent studies associate high IL-6 levels to the development or progression of breast, pulmonary, thyroids and rectal cancer as well as the progression and maintenance of immunological diseases [26-29]. IL-6, has also been reported as an early marker of post-operative inflammation, severe visceral leishmaniasis, malaria and sepsis shock [30-36]. Moreover, there is evidence that sick people with traumatic brain lesions present high IL-6 serum concentration are more likely to develop chronic symptoms [37].

Currently, the challenge is to identify where and when IL-6 is activated in inflammation in order to understand how the pleiotropic cytokine determines the progression, gravity and duration of different diseases.

Traditionally, IL-6 expression is measured through the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) technique [38], flow cytometry [39], conductivity immunosensor [40], chemiluminescent immunoassay [41] and fluorescence based on optic fiber biosensors [42, 43], which are considered sophisticated methods, but with high costs and dependent on large equipment. Some have a low detection limit, restricting measurement in some samples. Recently several electrochemical techniques have been applied for the construction of an IL-6 immunosensor with high sensitivity, good selectivity and low detection limit.

The objective of this manuscript was to conduct a review of original articles on this topic published over the last decade and of the body of patents related to IL-6 lateral flow assay.

## **2. METHODOLOGY**

For the technological mapping, a scientific technological prospective study on the important databases of National Institute of Industrial Property (INPI), European Patent Office (EPO) and United States Patent and Trademark Office (USPTO) with no time limitation was carried out. To search for articles the scientific databases Web of Science, PubMed, Science Direct and Scielo were used within the ten-year period.

First, the keywords “lateral flow assay”, “lateral flow immunoassay”, “lateral flow immunoassays”, “interleukin” and “interleukin 6” were used.

Next, we analyzed the articles and patents obtained with different combinations of these words such as “lateral flow assay AND interleukin”, “lateral flow assay AND interleukin 6”, “lateral flow immunoassay AND interleukin”, “lateral flow immunoassay AND interleukin 6”, “lateral flow immunoassays AND interleukin”, “lateral flow immunoassays AND interleukin 6”, so that the searches were refined according to the work done. In all cases the searches were limited to the fields “title, abstract and key-words”.

In the journal database Web of Science, the one with the highest number of publications with the keyword “lateral flow assay”, the amount of documents per year, the countries with the highest number of publications and the main application areas of this technology were analyzed. Taking into consideration the technological innovation for the specific immunosensor, we refined the search to the combinations of the keywords “lateral flow

immunoassay” AND “interleukin 6”, where we analyzed the database that presented the highest number of articles, Web of Science.

All the documents that presented these words in the title or in the abstract were considered and all the articles in which some kind of lateral flow immunosensor were developed to measure IL-6. Duplicate and review articles, as well as those whose methodology didn't report the development of the sensor were excluded.

### 3. RESULTS AND DISCUSSION

#### 3.1 Analysis of the published patents

Technological research has shown that the European database, Espacenet, presents the highest number of patents followed by the American USPTO. On the Brazilian database, INPI, only four patents have been found (Table 1). Our research has evidenced that if we use more up to date technical terms such as “immunoassay” we can see an even lower number of patents, showing the technological innovation of this kind of sensor.

**Table 1** –Number of patents found with the keywords on the Espacenet, USPTO and INPI databases.

Key	Espacenet	USPTO	INPI
Lateral flow assay	505	124	4
Lateral flow immunoassay	226	23	0
Lateral flow immunoassays	34	12	0
Interleukin	>10.000	4.698	17
Interleukin 6	2306	223	0

The results in Table 1 show that in Brazil, regarding technological innovation, the number of deposited patents is inferior to the number of deposits on the international databases, which shows that developed countries invest heavily in research and innovation. According to Arbix (2005) [44], Brazil has been unable to keep up with the world technological production regarding patents. Even though there has been an increase in the number of patenting in the world, Brazil has not followed the growth of countries like China and the USA.

After research with isolated keywords from our study, a refinement using combinations with two of these words was carried out (Table 2).

**Table 2** –Number of patents found combining two keywords related to the study on theEspacenet, USPTO and INPI databases.

Key	Espacenet	USPTO	INPI
<b>Lateral flow assay AND Interleukin</b>	0	0	0
<b>Lateral flow assay AND Interleukin 6</b>	0	0	0
<b>Lateral flow immunoassay AND Interleukin</b>	0	0	0
<b>Lateral flow immunoassay AND Interleukin 6</b>	0	0	0
<b>Lateral flow immunoassays AND Interleukin</b>	0	0	0
<b>Lateral flow immunoassays AND Interleukin 6</b>	0	0	0

Through refinement, we could observe that by combining the keywords no patents were found, regardless of the database searched, which evidences the originality and the technological aspect of the proposed theme.

### 3.2 Analysis of the published articles

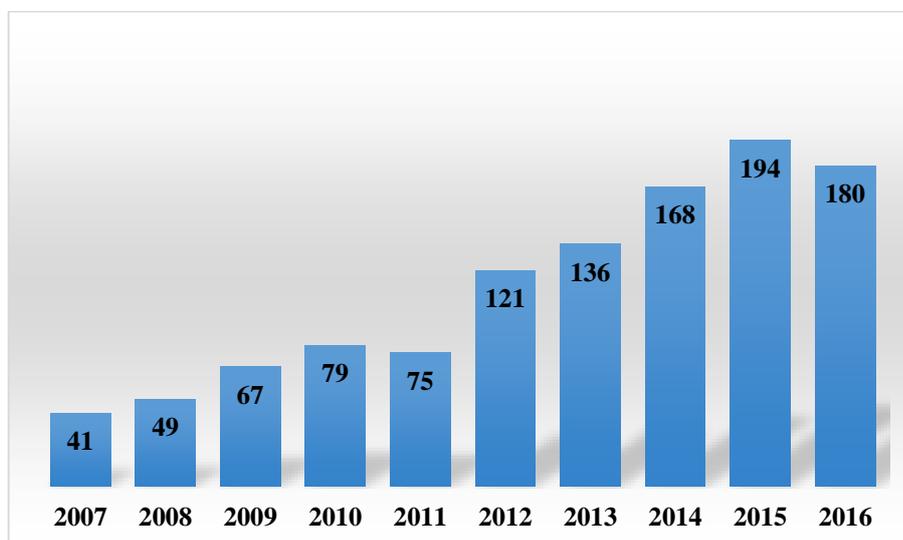
The number of scientific articles published with the keywords in the scientific databases Web of Science, PubMed, Science Direct and Scielo are illustrated on Table 3. By comparing the number of patents deposited in the national and international databases, we could realize that the number of published scientific articles with the keywords “interleukin” and “interleukin 6” is higher in relation to the technological terms since it is a broader term inserted in several clinical and scientific contexts. However, the number of publications with the technological innovation terms “lateral flow assay”, “lateral flow immunoassay” and “lateral flow immunoassays” is still small compared to the other researched keywords.

**Tabela 3** –Number of articles found with the keywords on the scientific databases Web of Science, PubMed, Science Direct e Scielo.

key	Web of Science	PubMed	Science Direct	Scielo
<b>Lateral flow assay</b>	1143	238	367	3
<b>Lateral flow immunoassay</b>	595	233	196	0
<b>Lateral flow immunoassays</b>	155	50	172	0
<b>Interleukin</b>	99.136	85.200	41.326	364
<b>Interleukin 6</b>	49.662	25.615	14.463	23

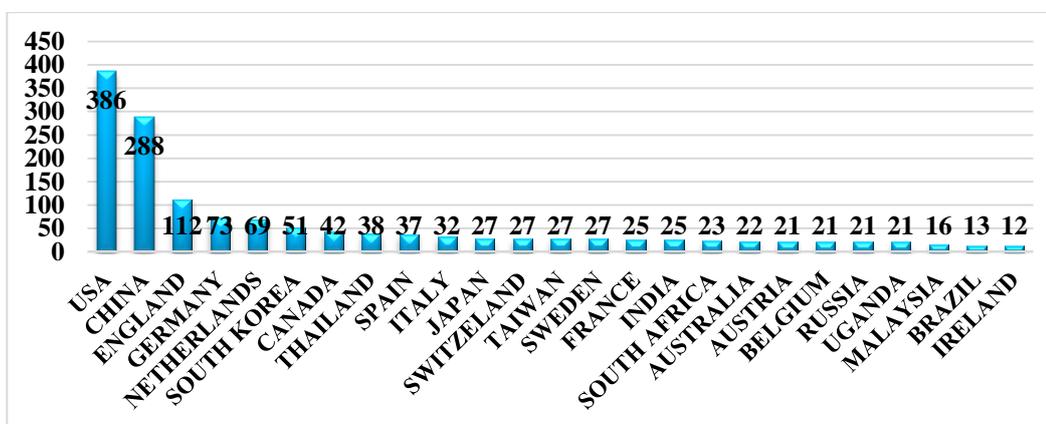
The analysis of the three searched keywords for biotechnology shows that the most used term in the publications was “lateral flow assay” and the database Web of Science presented

the highest number of articles in the last ten years, where 2014, 2015 and 2016 were the years with most publications (Figure 1).



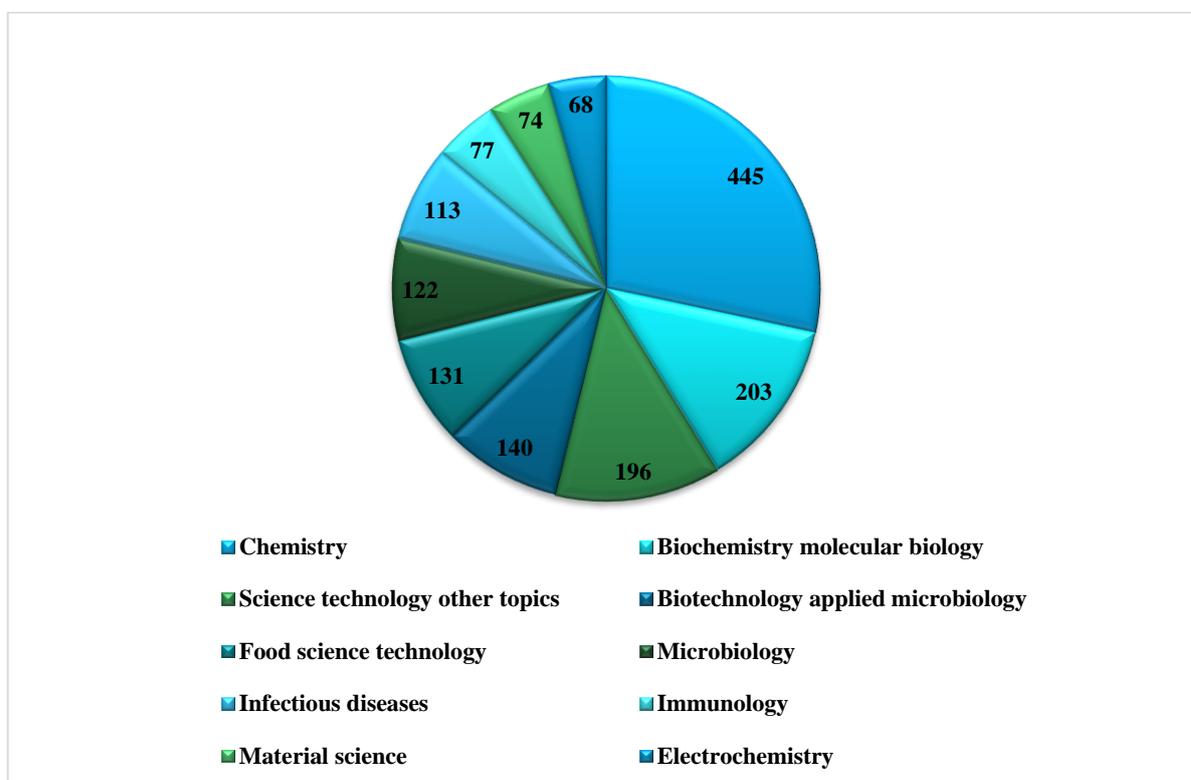
**Figure1**–Articles published in the last ten years with the keywords “lateral flow assay”.

The countries that presented the highest number of publications were the USA, 386 publications, followed by China with 288 publications. Brazil is the 24<sup>th</sup> country with 13 articles on the topic (Figure 2). This scenario shows that the top two countries in publications produce a lot of technology, therefore having a high budget available for research. By observing the scenario as a whole, we could see that although many countries in Europe have more stable economies than developing countries, the number of publications in Russia, Belgium, Australia and Austria is not much higher to Brazil’s.



**Figure 2** – Countries with publications containing the keyword “lateral flow assay”.

By diagnosing the main publication areas with these keywords, we could notice that the greatest areas of interest for publication are chemistry, science technology other topics and biochemistry molecular biology (Figure 3).



**Figure 3** – Publication areas with the keyword “lateral flow assay”.

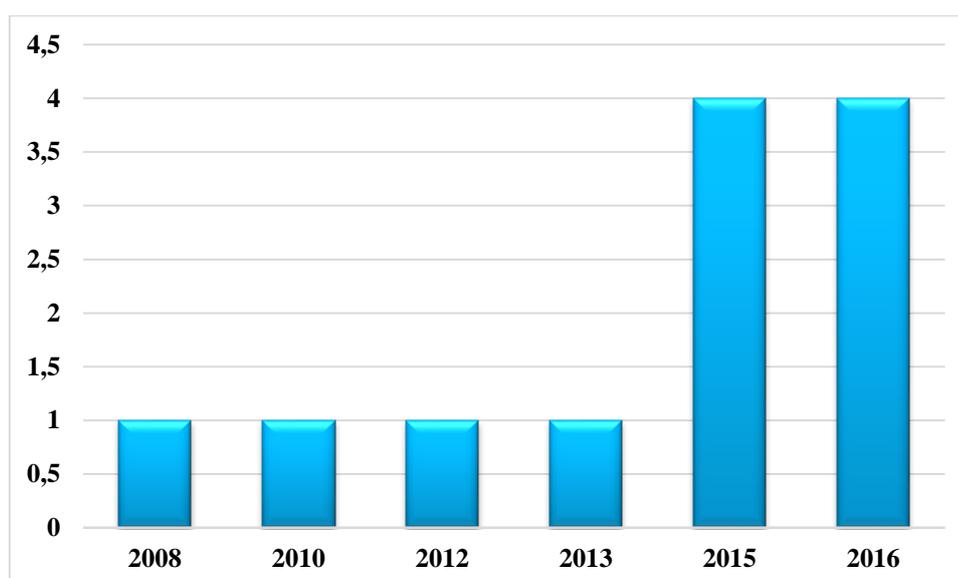
After analyzing the researched terms of interest, we scanned the four scientific databases for keyword combinations as represented on Table 4.

On the Web of Science database, we found articles for all the tested combinations. Twelve articles for the term “lateral flow assay AND interleukin”; 9 articles for the combination “lateral flow assay AND interleukin 6”; 13 articles for the combination “lateral flow immunoassay AND interleukin”; 12 for the specific term “lateral flow immunoassay AND interleukin 6”; the combinations “lateral flow immunoassays AND interleukin” and “lateral flow immunoassays AND interleukin 6” we found two articles. On the PubMed and Science Direct databases, we found a small number of articles for the specific combinations and on the Scielo database; we didn’t find any articles related to the researched topics.

**Table 4** –Number of articles published with the keyword combinations on the Web of Science, PubMed, Science Direct and Scielo databases.

Palavras-chave	Web of Science	PubMed	Science Direct	Scielo
<b>Lateral flow assay AND Interleukin</b>	12	2	4	0
<b>Lateral flow assay AND Interleukin 6</b>	9	1	4	0
<b>Lateral flow immunoassay AND Interleukin</b>	13	0	3	0
<b>Lateral Flow Immunoassay AND Interleukin 6</b>	12	0	3	0
<b>Lateral Flow Immunoassays AND Interleukin</b>	2	0	3	0
<b>Lateral Flow Immunoassays AND Interleukin 6</b>	2	0	0	0

Through the deputed analysis of the articles found on Web of Science, the database with the highest number of publications (12 articles) with the combination of keywords “lateral flow immunoassay AND interleukin 6” in the last ten years, we could notice that the highest number of publications was registered for the years 2015 and 2016, as illustrated on Figure 4.



**Figure 4** –Published articles in the last ten years with the keyword combination “Lateral flow immunoassay AND Interleukin 6” that were found in Web of Science database.

Twelve articles were found in the literature with the combinations “Lateral flow assay AND interleukin 6”, Table 5. However, seven of them didn’t describe in their methodology the immunosensor, reporting only the interleukin 6 measurement with the kit Milenia® QuickLine IL-6, whose reading were done through the Milenia® POCScan Reader equipment (Biotec GmbH, Giessen, Germany). These articles highlight the clinical trial used to characterize infections and didn’t related the development of the technology [45-52].

Prieto and collaborators (2010) [53] have done a study comparing the method efficiency (ECLIA, Roche Diagnostics) through electrochemiluminescence in the COBAS E601 analyzer equipment (Roche Diagnostics) with the semi-quantitative method (Milenia Biotec) in order to analyze the method efficiency [53].

Three articles written by Swanson and D’Andrea (2013) [54] approach the technology of developing or improving lateral flow sensors, in which a multiple quantitative lateral flow sensor that used infrared light for the detection was developed. The trial measures IL-6 in a scale of 0 to 100 pg/mL and reactive C protein of 50 to 2500 ng/mL on the same strip. The sensor developed by the authors uses antibody conjugates with fluorescent nanoparticles. However, the antibody conjugation process requires a lot of equipment and reagents, which increases the cost of the sensor. Once the conjugate has been prepared, the sensor has classic characteristics of an LFA sensor, however, the quantification of IL-6 is performed by fluorescence and not to the naked eye, like other commercial LFAs for other types of analytes, making it impossible to read on the bedside or in places without infrastructure, making difficult the rapid diagnosis. The sensor was very effective, with a limit of detection lower than the detection limit of the ELISA technique, which was used to compare the measures of IL-6 in the proposed study.

Other two articles written by the same group report the development of a LFA for IL-6 and TNF- $\alpha$  on the same strip using fluorescent microspheres with a detection limit of 7.15 pg/mL and 10.7 pg/mL, respectively [55, 56]. As reported by the author, the limitation of the study was on the quality of the fluorescent microspheres, because for some reading spectra, the signal strength was low. Again, this type of sensor requires equipment for reading of IL-6, hindering the bedside diagnosis. In this study the authors evaluated plasma samples at normal viscosity, and in hydrogel, increased viscosity, where the limit of detection of the latter was not as low as in the standard solution. Better uniformity was reported on the sensor test strip, when the viscosity of the plasma was varied, leaving the test more uniform, an important factor when the objective is a single test for multiple proteins. The limit of detection of this system was improved in the most recent study [55], after conjugation of these fluorescent microspheres

with modified carboxylate, since the signal intensity and uniformity for the detection of IL-6 were improved. The authors also evaluated the quality of the conjugate by observing the profile and size of the nanoparticles, aggregation of the nanoparticles to the antibodies, oligomerization of the antibody, among other parameters, in order to decrease the effect of interfering substances that may influence the diagnostic and the detection limit [56].

#### **4. CONCLUSION**

The data presented by the technological mapping have shown that the development IL-6 lateral flow immunosensors is innovative, since we couldn't find patents describing this kind of biosensor. The scientific prospection reports the development of two lateral flow immunosensors. However, the observation is still not done without using some kind of technology for colorimetric detect like the one we propose.

#### **5. FUTURE PESPECTIVES**

In Brazil, a lateral flow sensor for IL-6 is currently being developed, which is affordable and fast reading, without needing FTIR and fluorescence equipment, as has been reported in the literature. We cannot provide many details about this device because it is under intellectual property registration, but we can emphasize that this sensor is unprecedented and able to read the test for IL-6 at the naked eye, in a colorimetric way, without needing equipment, which greatly facilitates its application in the clinical phase and bedside diagnostics. Currently, this sensor is in the clinical trials phase in bedside patients, with quite satisfactory results. The prospect is that this device will soon be commercially available. A publication with more details of this sensor will also be available soon.

#### **ACKNOWLEDGEMENTS**

This work was supported by CNPq and CAPES. We thank Emanuel Airton de Oliveira Faria, Paulo Ronaldo Sousa Teixeira and Ana Siqueira do Nascimento Teixeira.

## REFERENCES

- [1] SINGER JM, PLOTZ CM. The latex fixation test. I. Application to the serologic diagnosis of rheumatoid arthritis. *Am J Med.* 1956; 21(6): 888-892.
- [2] ELLERBEE AK, PHILLIPS ST, SIEGEL AC, et al. Quantifying colorimetric assays in paper-based microfluidic devices by measuring the transmission of light through paper. *Anal Chem.* 2009; 81(20): 447-52.
- [3] HOLZINGER M, LE GOFF A, COSNIER S. Nanomaterials for biosensing applications: a review. *Front Chem.* 2014; 2(63): 1-10.
- [4] DIAS JT, SVEDBERG G, NYSTRAND M, ANDERSSON-SVAHN H, GANTELIUS J. Rapid signal enhancement method for nanoprobe-based biosensing. *Sci Rep.* 2017; 7(1): 6837.
- [5] SHARMA S, ZAPATERO-RODRÍGUEZ J, ESTRELA P, O'KENNEDY R. Point-of-Care Diagnostics in Low Resource Settings: Present Status and Future Role of Microfluidics. *Biosensors (Basel).* 2015; 5(3): 577-601.
- [6] POSTHUMA-TRUMPIE GA, KORF J, VAN AMERONGEN A. Lateral flow (immuno)assay: Its strengths, weaknesses, opportunities and threats. A literature survey. *Anal Bioanal Chem.* 2009; 393(2): 569-82.
- [7] SONG S, QIN Y, HE Y, HUANG Q, FAN C, CHEN HY. Functional nanoprobe for ultrasensitive detection of biomolecules. *Chem Soc Rev.* 2010; 39(11): 4234-43.
- [8] PAROLO C, MERKOČI A. Paper-based nanobiosensors for diagnostics. *Chem Soc Rev.* 2013; 42(2): 450-7.
- [9] PAROLO C, DE LA ESCOSURA-MUÑIZ A.; MERKOČI A. Enhanced lateral flow immunoassay using gold nanoparticles loaded with enzymes. *Biosens Bioelectron.* 2013; 40(1): 412-6.
- [10] QUESADA-GONZÁLEZ D, MERKOČI A. Nanoparticle-based lateral flow biosensors. *Biosens Bioelectron.* 2015; 73:47-63.
- [11] WANG S, QUAN Y, LEE N, KENNEDY IR. Rapid determination of fumonisin B1 in food samples by enzyme-linked immunosorbent assay and colloidal gold immunoassay. *J Agric Food Chem.* 2006; 54(7): 2491-5.
- [12] KOETS M, SANDER I, BOGDANOVIC J, DOEKES G, VAN AMERONGEN A. A rapid lateral flow immunoassay for the detection of fungal alpha-amylase at the workplace. *J Environ Monit.* 2006; 8(9): 942-6.
- [13] NIELSEN K, YU WL, KELLY L. Development of a lateral flow assay for rapid detection of bovine antibody to *Anaplasma marginale*. *J Immunoassay Immunochem.* 2008; 29(1):10-8.
- [14] HUANG X, AGUILAR ZP, XU H, LAI W, XIONG Y. Membrane-based lateral flow

immuno-chromatographic strip with nanoparticles as reporters for detection: A review. *Biosens Bioelectron.* 2016; 75:166-80.

[15] KALLEMPUDI SS, ALTINTAS Z, NIAZI JH, GURBUZ Z. A new microfluidics system with a hand-operated, on-chip actuator for immunosensor applications. *Sens Actuators B Chem.* 2012; 163(1): 194-201.

[16] AHN S, FREEDMAN DS, MASSARI P, CABODI M, ÜNLÜ MS. A mass-tagging approach for enhanced sensitivity of dynamic cytokine detection using a label-free biosensor. *Langmuir.* 2013; 29(17): 5369-76.

[17] HUANG J, HARVEY J, DERRICK FAM WH, NIMMO MA, ALFRED TOK.IY. Novel biosensor for interleukin-6 detection. *Procedia Eng.* 2013; 60: 195-200.

[18] TSUNEYASU M, SASAKAWA C, NARUISHI N, TANAKA Y, YOSHIDA Y, TAWA K. Sensitive detection of interleukin-6 on a plasmonic chip by grating coupled surface plasmon field enhanced fluorescence imaging by grating-coupled surface plasmon field enhanced fluorescence imaging. *Jpn. J. Appl. Phys.* 2014; 53(6S): 2-7.

[19] LOU Y, HE T, JIANG F, SHI JJ, ZHU JJ. A competitive electrochemical immunosensor for the detection of human interleukin-6 based on the electrically heated carbon electrode and silver nanoparticles functionalized labels. *Talanta.* 2014; 122:135-9.

[20] OJEDA I, MORENO-GUZMÁN M, GONZÁLEZ-CORTÉS A, YÁÑEZ-SEDEÑO P, PINGARRÓN JM. Electrochemical magnetoimmunosensor for the ultrasensitive determination of interleukin-6 in saliva and urine using poly-HRP streptavidin conjugates as labels for signal amplification. *Anal Bioanal Chem.* 2014; 406(25): 6363-71

[21] LAU UY, SAXER SS, LEE J, BAT E, MAYNARD HD. Direct Write Protein Patterns for Multiplexed Cytokine Detection from Live Cells Using Electron Beam Lithography. *ACS Nano.* 2016; 10(1): 723-9.

[22] CHEN H, CHOO TK, HUANG J. et al.. Label-free electronic detection of interleukin-6 using horizontally aligned carbon nanotubes. *Mater Des.* 2016; 90: 852–857.

[23] HIRANO T. Revisiting the 1986 molecular cloning of interleukin 6. *Front Immunol.* 2014; 5: 456.

[24] HUNTER CA, JONES SA. IL-6 as a keystone cytokine in health and disease. *Nat Immunol.* 2015;16(5): 448-5.

[24] SCHETT G, ELEWAUT D, MCINNES IB, DAYER JM, NEURATH MF. How cytokine networks fuel inflammation: Toward a cytokine-based disease taxonomy. *Nat Med.* 2013; 19(7): 822-4.

[25] LIPPITZ BE. Cytokine patterns in patients with cancer: A systematic review. *Lancet Oncol.* 2013;14(6):e218-28.

- [26] DI CARO G, CARVELLO M, PESCE S, et al. Circulating Inflammatory Mediators as Potential Prognostic Markers of Human Colorectal Cancer. *PLoS One*. 2016; 11(2): e0148186. doi: 10.1371/journal.pone. 0148186. eCollection.
- [27] LIPPITZ BE, HARRIS RA. Cytokine patterns in cancer patients: A review of the correlation between interleukin 6 and prognosis. *Oncoimmunology*. 2016; 5(5): e1093722.
- [28] LIU CY, XIE WG, WU S, TIAN JW, LI J. A comparative study on inflammatory factors and immune functions of lung cancer and pulmonary ground-glass attenuation. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2017; 21(18): 4098-4103.
- [29] MARTINS MB, MARCELLO MA, BATISTA FA, et al. Serum interleukin measurement may help identify thyroid cancer patients with active disease. *Clin Biochem*. 2017;pii: S0009-9120(17): 30909-8.
- [30] COSTA DL, ROCHA RL, CARVALHO RM, et al. Serum cytokines associated with severity and complications of kala-azar. *Pathog Glob Health*. 2013; 107(2): 78-87.
- [31] DI CESARE PE, CHANG E, PRESTON CF, LIU CJ. Serum interleukin-6 as a marker of periprosthetic infection following total hip and knee arthroplasty. *J Bone Joint Surg Am*. 2005; 87(9): 1921-7.
- [32] RANDAU TM, FRIEDRICH MJ, WIMMER MD, et al. Interleukin-6 in serum and in synovial fluid enhances the differentiation between periprosthetic joint infection and aseptic loosening. *PLoS ONE*. 2014;9(2): e89045.
- [33] CHAVES YO, DA COSTA AG, PEREIRA ML, et al. Immune response pattern in recurrent *Plasmodium vivax* malaria. *Malar J*. 2016; 15(1): 445.
- [34] COSTA DL, ROCHA RL, CHAVES EB, BATISTA VG, COSTA HL, COSTA CH. Predicting death from kala-azar: construction, development, and validation of a score set and accompanying software. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2016; 49(6): 728-740
- [35] RAMOS PK, CARVALHO KI, ROSA DS, et al. Serum Cytokine Responses over the Entire Clinical-Immunological Spectrum of Human Leishmania (L.) infantum chagasi Infection. *Biomed Res Int*. 2016; 2016:693798.
- [36] SCHERER EF, CANTARINI DG, SIQUEIRA R, et al. Cytokine modulation of human blood viscosity from vivax malaria patients. *Acta Trop*. 2016; 158:139-47.
- [37] HERGENROEDER GW, MOORE AN, MCCOY JP JR, et al. Serum IL-6: a candidate biomarker for intracranial pressure elevation following isolated traumatic brain injury. *J neuroinflammation*. 2010;7:19.
- [38] TURNER CK, BLIEDEN TM, SMITH TJ, et al. A novel ELISpot method for adherent cells. *J Immunol Methods*. 2004; 291(1-2): 63-70.
- [39] STELMASZCZYK-EMMEL A, KOPATYS A, GÓRSKA E, GŁODKOWSKA-MRÓWKA E, DEMKOW U. The usefulness of flow cytometric analysis of cytokines in peripheral blood and bone marrow plasma. *Postepy Hig Med Dosw (Online)*. 2013; 67: 879-86.

- [40] LIANG K, MU W, HUANG M, YU Z, LAI Q. Simultaneous detection of five indices of hepatitis B based on an integrated automatic microfluidic device. *Biomed Microdevices*. 2007; 9(3): 325-33.
- [41] LUO L, ZHANG Z, HOU L, WANG J, TIAN W. The study of a chemiluminescence immunoassay using the peroxyoxalate chemiluminescent reaction and its application. *Talanta*. 2007; 72(4): 1293-7.
- [42] KAPOOR R, WANG CW. Highly specific detection of interleukin-6 (IL-6) protein using combination tapered fiber-optic biosensor dip-probe. *Biosens Bioelectron*. 2009; 24(8): 2696-701.
- [43] WANG CW, KAPOOR R. Dissociation constant measurement using combination tapered fiber-optic biosensor (CTFOB) dip-probes. *Proc SPIE Int Soc Opt Eng*. 2010; 7559 (75590A).
- [44] ARBIX G, SALERMO MS, DE NEGRI JA. O impacto da internacionalização com foco na inovação tecnológica sobre as exportações das firmas brasileiras. *Dados*, Rio de Janeiro, Instituto Universitário de Pesquisas do Rio de Janeiro (Iuperj). 2005; 48(2): 395-442.
- [45] DENGLER J, SCHEFOLD JC, GRAETZ D. Point-of-care testing for interleukin-6 in cerebro spinal fluid (CSF) after subarachnoid haemorrhage. *Med Sci Monit*. 2008; 14(12): BR265-8.
- [46] CHAEMSAITHONG P, ROMERO R, KORZENIEWSKI SJ, et al. A point of care test for the determination of amniotic fluid interleukin-6 and the chemokine CXCL-10/IP-10. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2015; 28(13): 1510-9.
- [47] CHAEMSAITHONG P, ROMERO R, KORZENIEWSKI SJ, et al. A rapid interleukin-6 bedside test for the identification of intra-amniotic inflammation in preterm labor with intact membranes. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2016; 29(3): 349-59.
- [48] CHAEMSAITHONG P, ROMERO R, KORZENIEWSKI SJ, et al. A point of care test for interleukin-6 in amniotic fluid in preterm prelabor rupture of membranes: a step toward the early treatment of acute intra-amniotic inflammation/infection. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2016; 29(3): 360-7.
- [49] MUSILOVA I, KUTOVÁ R, PLISKOVA L, et al. Intraamniotic inflammation in women with preterm prelabor rupture of membranes. *PLoS ONE*, 2015; 10(7): e0133929.
- [50] MUSILOVA I, BESTVINA T, HUDECKOVA M, et al. Vaginal fluid interleukin-6 concentrations as a point-of-care test is of value in women with preterm prelabor rupture of membranes. *Am J Obstet Gynecol*. 2016; 215(5): 619.e1-619.e1.
- [51] KACEROVSKY M, VRBACKY F, KUTOVA R, et al. Cervical microbiota in women with preterm prelabor rupture of membranes. *PLoS ONE*, 2015; 10(5): e0126884.
- [52] KUNZE M, KLAR M, MORFELD CA, et al. Cytokines in noninvasively obtained amniotic fluid as predictors of fetal inflammatory response syndrome. *Am J Obstet Gynecol*. 2016; 215(1): 96.e1-8.

[53] PRIETO B, MIGUEL D,COSTA M, COTO D, ALVAREZ FV. New quantitative electrochemiluminescence method (ECLIA) for interleukin-6 (IL-6) measurement. *Clin Chem Lab Med.* 2010; 48(6): 835-8.

[54] SWANSON C, D'ANDREA A. Lateral flow assay with near-infrared dye for multiplex detection. *Clin Chem.* 2013; 59(4): 641-8.

[55] WORSLEY GJ, ATTREE SL, NOBLE JE, HORGAN AM. Rapid duplex immunoassay for wound biomarkers at the point-of-care. *Biosens Bioelectron.* 2012; 34(1): 215-2.

[56] WORSLEY GJ, KUMARSWAMI N, MINELLI C, NOBLE JE. Characterisation of antibody conjugated particles and their influence on diagnostic assay response. *Anal. Methods.* 2015; 7: 9596-9603.

## APÊNDICE 6. Termos de Consentimento Livre e Esclarecido

### **Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para Crianças, Adolescentes e Pessoas Incapacitadas de Decidir.**

Ao assinar este documento, você estará concordando em participar de uma pesquisa médica. Chamada: **“Detecção rápida da citocina IL-6 para identificação da LV grave”**. Este estudo está sendo realizado neste hospital como parte de uma pesquisa.

**1. Objetivo:** O objetivo deste estudo é conseguir detectar previamente as razões do sangramento que muitos pacientes com calazar apresentam. Os médicos sabem bem que pessoas com calazar podem apresentar sangramentos no nariz, na boca, no estômago, no intestino, na pele, enfim em vários locais. Estes sangramentos podem ser muito graves e muitas vezes o tratamento não tem bons resultados. Se os médicos conseguirem entender melhor porque acontecem estes sangramentos eles poderão encontrar tratamentos mais eficazes e assim salvar mais vidas e diminuir mais o sofrimento das pessoas com esta doença.

#### **Explicação do “Termo de Consentimento Livre e Esclarecido”.**

**2. Título do estudo:** “Detecção rápida da citocina IL-6 para identificação da LV grave.”

Investigadores responsáveis: Dr. Carlos Henrique Nery Costa, Dra. Dorcas Lamounier Costa e Ingridi de Souza Sene.

Informação sobre a participação: O \_\_\_\_\_ recebeu o diagnóstico de leishmaniose visceral (Calazar). O calazar é causado por micróbios que são transmitidos por picadas de um pequeno inseto conhecido como "asa de palha", “mosquito palha” ou "cangalhinha". Os micróbios, chamados leishmanias, invadem o fígado, baço e a medula dos ossos, onde o sangue é produzido, e provocam emagrecimento, febre, anemia e aumento da barriga. O calazar pode levar a pessoa à morte se não for tratado. E, infelizmente, mesmo com os remédios que dispomos hoje, algumas pessoas não se recuperam. Nesta situação triste, quase sempre a morte acontece porque a pessoa tem infecções graves ou porque tem sangramentos incontroláveis.

O \_\_\_\_\_ foi convidado a participar de uma pesquisa médica para podermos detectar as pessoas que poderão ter sangramento e desenvolver a forma grave do calazar. É importante que se entenda que: (1) Esta participação é totalmente voluntária. (2) A participação poderá ser interrompida a qualquer momento. A recusa em participar não implicará em nenhum prejuízo e o tratamento continuará da melhor forma possível. (3) O Sr. (A Sra.) pode fazer qualquer pergunta que desejar para entender melhor o estudo.

**3. Procedimentos a serem seguidos.** Se o Sr. (a Sra.) concordar que

---

Participe deste estudo, ele (ela) será internado no hospital, onde uma história médica e um exame físico serão realizados. No primeiro dia do estudo serão colhidos os exames de sangue, necessários para orientar o tratamento. Pequenas quantidades de sangue a mais serão necessárias para realizar a detecção da citocina IL-6 e outros possíveis marcadores para identificação do sangramento e gravidade do calazar. Em caso de aparecer sangramento depois da internação, uma nova amostra de sangue será necessária.

As quantidades de sangue são muito pequenas e só serão colhidas no momento da internação ou do aparecimento de sangramento. Contudo, exames periódicos poderão ser necessários para o acompanhamento do tratamento, independente da pesquisa. A sua participação terá uma duração média 20 a 30 dias, apenas o tempo necessário para se tratar o calazar.

**3.a. Armazenamento de material biológico.** Uma amostra pequena do sangue e da medula óssea será armazenada para a necessidade de estudos futuros.

**4. Riscos, danos e desconforto.** A participação de uma pessoa neste trabalho praticamente não envolve risco. A maior parte dos exames que serão realizados faz parte de uma rotina para qualquer pessoa com a possibilidade de estar com calazar. Uma pequena quantidade a mais de sangue vai ser necessária para os testes. É importante que você saiba que há riscos envolvendo o tratamento do calazar, independentes da pesquisa. O calazar é quase sempre fatal quando não tratado e o tratamento, embora quase sempre seja eficaz, ocasionalmente pode falhar.

**5. Benefícios.** A pessoa que participar deste estudo não terá nenhum prejuízo, mas também não terá um benefício pessoal imediato. No entanto, ela estará colaborando em um estudo científico que poderá beneficiar outras pessoas que porventura tenham a mesma doença. Ninguém receberá auxílio financeiro pela participação neste estudo, mas também não terá gastos decorrentes da participação. O atendimento médico e o tratamento estão assegurados pelo Serviço Único de Saúde –SUS e obedecerão as melhores recomendações do país.

**6. Compromisso de confidencialidade da identidade do voluntário.** Os registros desta participação serão mantidos confidenciais. Entretanto, estes registros poderão ser analisados por representantes da Universidade Federal do Piauí. Isto faz parte da responsabilidade destes órgãos em acompanhar a pesquisa. Seu nome nunca será divulgado em nenhum relatório deste estudo.

**7. Novos achados significativos.** Qualquer informação importante que surgir durante sua participação no estudo e que possa afetar a sua saúde será levada ao seu conhecimento, através dos médicos responsáveis (Dra. Dorcas e Dr. Carlos Henrique). Eles entrarão em contato com o Sr (a Sra) através de carta, telegrama ou telefone, no endereço indicado por você.

**8. Indenizações e ressarcimentos.** Caso fique comprovado que o (a) \_\_\_\_\_ foi prejudicado devido à sua participação no estudo, haverá direito a tratamento médico integral e à indenização conforme previsto no item V.6 da Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde do Ministério da Saúde sobre pesquisas médicas envolvendo seres humanos, que estabelece: *“Os sujeitos da pesquisa que vierem a sofrer qualquer tipo de dano previsto ou não no termo de consentimento e resultante de sua participação, além do direito à assistência integral, tem direito à indenização”*. “O Sr (A Sra) terá conhecimento de qualquer informação nova descoberta durante o estudo que possa fazer com que você mude de ideia quanto a permanecer no mesmo”.

**9. Pessoas e locais para respostas, perguntas e informações relacionadas ao estudo.** Por favor, entre em contato com uma das pessoas abaixo caso você tenha perguntas relacionadas com esta pesquisa médica:

Dra. Dorcas Lamounier Costa, pelo telefone (86) 3221 3413

Dr. Carlos Henrique Nery Costa, pelo telefone (86) 3221-3413

SE O SR (A SRA) NÃO ENTENDEU ALGUMA PARTE DESTES DOCUMENTOS, PERGUNTE AO INVESTIGADOR ANTES DE ASSINAR. UMA CÓPIA DESTES TERMOS DE CONSENTIMENTO LHE SERÁ ENTREGUE EM SEGUIDA.

#### FORMULÁRIO DE CONTATO COM O PACIENTE

Nº do paciente em estudo: \_\_\_\_\_ Registro do IDTNP \_\_\_\_\_  
Nome do paciente: \_\_\_\_\_  
Data de nascimento: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ Sexo: \_\_\_\_\_  
Nome da mãe: \_\_\_\_\_  
Nome do pai: \_\_\_\_\_  
Informante/ Acompanhante: \_\_\_\_\_  
Parentesco: \_\_\_\_\_ Telefone: \_\_\_\_\_  
Tel. residencial: ( ) \_\_\_\_\_ Tel. comercial: ( ) \_\_\_\_\_ Tel. público: ( ) \_\_\_\_\_  
Endereço para correspondência: \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
Ponto de referência: \_\_\_\_\_

**Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para crianças, adolescentes e pessoas incapacitadas de decidir: declaração do responsável**

Eu, \_\_\_\_\_, com 18 anos de idade ou mais, detentor de (nome do responsável) integral competência para decidir por \_\_\_\_\_ torna-o um menor (nome do paciente menor) voluntário para participar do estudo denominado **“Detecção rápida da citocina IL-6 para identificação da LV grave.”** As implicações desta participação voluntária, incluindo a natureza, duração e objetivo do estudo, os métodos e meios através dos quais ele será conduzido, assim como as inconveniências e riscos esperados foram explicados a mim. Tive a oportunidade de esclarecer todas as dúvidas que eu tinha a respeito do estudo. Estou de acordo de que uma amostra do sangue sejam armazenados para pesquisas futuras.

Entendo que em qualquer momento posso desistir da participação neste estudo sem que este indivíduo sofra nenhuma punição ou perda de seus direitos. Eu recebi uma cópia deste termo de consentimento.

\_\_\_\_\_  
Nome do responsável

\_\_\_\_\_  
Assinatura ou impressão digital do responsável

Data \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ às \_\_\_\_\_ horas

**Declaração da testemunha:**

Eu presenciei a explicação acima descrita, posso confirmar a oportunidade concedida ao responsável pelo paciente de fazer perguntas neste documento e testemunhar a assinatura do mesmo.

\_\_\_\_\_  
Nome da testemunha

\_\_\_\_\_  
Assinatura ou impressão digital da testemunha

Data \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ às \_\_\_\_\_ horas

**Declaração do investigador:**

Eu expliquei o objetivo deste estudo ao voluntário. No melhor do meu conhecimento, ele entendeu o objetivo, procedimentos, riscos e benefícios deste estudo. Declaro também que o responsável paciente recebeu uma cópia do termo de consentimento.

\_\_\_\_\_  
Nome do investigador

\_\_\_\_\_  
Assinatura do investigador

Data \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ às \_\_\_\_\_ horas.

## Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para Adultos

Ao assinar este documento, você estará concordando em participar de uma pesquisa médica. Chamada: **“Detecção rápida da citocina IL-6 para identificação da LV grave”**. Este estudo está sendo realizado neste hospital como parte de uma pesquisa.

**1. Objetivo:** O objetivo deste estudo é conseguir detectar previamente as razões do sangramento que muitos pacientes com calazar apresentam. Os médicos sabem bem que pessoas com calazar podem apresentar sangramentos no nariz, na boca, no estômago, no intestino, na pele, enfim em vários locais. Estes sangramentos podem ser muito graves e muitas vezes o tratamento não tem bons resultados. Se os médicos conseguirem entender melhor porque acontecem estes sangramentos eles poderão encontrar tratamentos mais eficazes e assim salvar mais vidas e diminuir mais o sofrimento das pessoas com esta doença.

**Explicação do “Termo de Consentimento Livre e Esclarecido”.**

**2. Título do estudo:** “Detecção rápida da citocina IL-6 para identificação da LV grave.”

Investigadores responsáveis: Dr. Carlos Henrique Nery Costa, Dra. Dorcas Lamounier Costa e Ingridi de Souza Sene.

Informação sobre a participação: O \_\_\_\_\_ recebeu o diagnóstico de leishmaniose visceral (Calazar). O calazar é causado por micróbios que são transmitidos por picadas de um pequeno inseto conhecido como "asa de palha", “mosquito palha” ou "cangalhinha". Os micróbios, chamados leishmanias, invadem o fígado, baço e a medula dos ossos, onde o sangue é produzido, e provocam emagrecimento, febre, anemia e aumento da barriga. O calazar pode levar a pessoa à morte se não for tratado. E, infelizmente, mesmo com os remédios que dispomos hoje, algumas pessoas não se recuperam. Nesta situação triste, quase sempre a morte acontece porque a pessoa tem infecções graves ou porque tem sangramentos incontroláveis.

O \_\_\_\_\_ foi convidado a participar de uma pesquisa médica para podermos detectar as pessoas que poderão ter sangramento e desenvolver a forma grave do calazar. É importante que se entenda que: (1) Esta participação é totalmente voluntária. (2) A participação poderá ser interrompida a qualquer momento. A recusa em participar não implicará em nenhum prejuízo e o tratamento continuará da melhor forma possível. (3) O Sr. (A Sra.) pode fazer qualquer pergunta que desejar para entender melhor o estudo.

**3. Procedimentos a serem seguidos.** Se o Sr. (a Sra.) concordar que

---

participe deste estudo, ele (ela) será internado no hospital, onde uma história médica e um exame físico serão realizados. No primeiro dia do estudo serão colhidos os exames de sangue, necessários para orientar o tratamento. Pequenas quantidades de sangue a mais serão necessárias para realizar a detecção da citocina IL-6 e outros possíveis marcadores para identificação do sangramento e gravidade do calazar. Em caso de aparecer sangramento depois da internação, uma nova amostra de sangue será necessária. As quantidades de sangue são muito pequenas e só serão colhidas no momento da internação ou do aparecimento de sangramento. Contudo, exames periódicos poderão ser necessários para o acompanhamento do tratamento, independente da pesquisa. A sua participação terá uma duração média 20 a 30 dias, apenas o tempo necessário para se tratar o calazar.

**3.a. Armazenamento de material biológico.** Uma amostra pequena do sangue e da medula óssea será armazenada para a necessidade de estudos futuros.

**4. Riscos, danos e desconforto.** A participação de uma pessoa neste trabalho praticamente não envolve risco. A maior parte dos exames que serão realizados faz parte de uma rotina para qualquer pessoa com a possibilidade de estar com calazar. Uma pequena quantidade a mais de sangue vai ser necessária para os testes. É importante que você saiba que há riscos envolvendo o tratamento do calazar, independentes da pesquisa. O calazar é quase sempre fatal quando não tratado e o tratamento, embora quase sempre seja eficaz, ocasionalmente pode falhar.

**5. Benefícios.** A pessoa que participar deste estudo não terá nenhum prejuízo, mas também não terá um benefício pessoal imediato. No entanto, ela estará colaborando em um estudo científico que poderá beneficiar outras pessoas que porventura tenham a mesma doença. Ninguém receberá auxílio financeiro pela participação neste estudo, mas também não terá gastos decorrentes da participação. O atendimento médico e o tratamento estão assegurados pelo Serviço Único de Saúde –SUS e obedecerão as melhores recomendações do país.

**6. Compromisso de confidencialidade da identidade do voluntário.** Os registros desta participação serão mantidos confidenciais. Entretanto, estes registros poderão ser analisados por representantes da Universidade Federal do Piauí. Isto faz parte da responsabilidade destes órgãos em acompanhar a pesquisa. Seu nome nunca será divulgado em nenhum relatório deste estudo.

**7. Novos achados significativos.** Qualquer informação importante que surgir durante sua participação no estudo e que possa afetar a sua saúde será levada ao seu conhecimento, através dos médicos responsáveis (Dra. Dorcas e Dr. Carlos Henrique). Eles entrarão em contato com o Sr (a Sra) através de carta, telegrama ou telefone, no endereço indicado por você.

**8. Indenizações e ressarcimentos.** Caso fique comprovado que o (a) \_\_\_\_\_ foi prejudicado devido à sua participação no estudo, haverá direito a tratamento médico integral e à indenização conforme previsto no item V.6 da Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde do Ministério da Saúde sobre pesquisas médicas envolvendo seres humanos, que estabelece: “*Os sujeitos da pesquisa que vierem a sofrer qualquer tipo de dano previsto ou não no termo de consentimento e resultante de sua participação, além do direito à assistência integral, tem direito à indenização*”. “O Sr (A Sra) terá conhecimento de qualquer informação nova descoberta durante o estudo que possa fazer com que você mude de ideia quanto a permanecer no mesmo”.

**9. Pessoas e locais para respostas, perguntas e informações relacionadas ao estudo.** Por favor, entre em contato com uma das pessoas abaixo caso você tenha perguntas relacionadas com esta pesquisa médica:

Dra. Dorcas Lamounier Costa, pelo telefone (86) 3221 3413

Dr. Carlos Henrique Nery Costa, pelo telefone (86) 3221-3413

SE O SR (A SRA) NÃO ENTENDEU ALGUMA PARTE DESTES DOCUMENTOS, PERGUNTE AO INVESTIGADOR ANTES DE ASSINAR. UMA CÓPIA DESTES TERMOS DE CONSENTIMENTO LHE SERÁ ENTREGUE EM SEGUIDA.

## FORMULÁRIO DE CONTATO COM O PACIENTE

Nº do paciente em estudo: \_\_\_\_\_ Registro do IDTNP \_\_\_\_\_  
Nome do paciente: \_\_\_\_\_  
Data de nascimento: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ Sexo: \_\_\_\_\_  
Nome da mãe: \_\_\_\_\_  
Nome do pai: \_\_\_\_\_  
Informante/ Acompanhante: \_\_\_\_\_  
Parentesco: \_\_\_\_\_ Telefone: \_\_\_\_\_  
Tel. residencial: ( ) \_\_\_\_\_ Tel. comercial: ( ) \_\_\_\_\_ Tel. público: ( ) \_\_\_\_\_  
Endereço para correspondência: \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
Ponto de referência: \_\_\_\_\_

### Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para Adultos: declaração do paciente

Eu, \_\_\_\_\_, com 18 anos de idade ou mais, em pleno gozo (nome do voluntário) das minhas faculdades mentais, concordo em participar como voluntário no estudo denominado **“Detecção rápida da citocina IL-6 para identificação da LV grave”**.

As implicações de minha participação voluntária, incluindo a natureza, duração e objetivo do estudo, os métodos e meios através dos quais ele será conduzido, assim como as inconveniências e riscos esperados foram explicados a mim. Tive a oportunidade de esclarecer todas as dúvidas que eu tinha a respeito do estudo. Estou de acordo de que uma amostra do meu sangue e da minha medula óssea sejam armazenados para pesquisas futuras. Entendo que em qualquer momento posso desistir de participar do estudo sem sofrer nenhuma punição ou perda de meus direitos. Eu recebi uma cópia deste termo de consentimento.

\_\_\_\_\_  
Nome do voluntário

\_\_\_\_\_  
Assinatura ou impressão digital do voluntário

Data \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ às \_\_\_\_\_ horas

#### Declaração da testemunha:

Eu presenciei a explicação acima descrita, posso confirmar a oportunidade concedida ao voluntário de fazer perguntas e a assinatura do mesmo.

\_\_\_\_\_  
Nome da testemunha

\_\_\_\_\_  
Assinatura ou impressão digital da testemunha

Data \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ às \_\_\_\_\_ horas

#### Declaração do investigador:

Eu expliquei o objetivo deste estudo ao voluntário. No melhor do meu conhecimento, ele entendeu o objetivo, procedimentos, riscos e benefícios deste estudo. Declaro também que o responsável paciente recebeu uma cópia do termo de consentimento.

\_\_\_\_\_  
Nome do investigador

\_\_\_\_\_  
Assinatura do investigador

Data \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ às \_\_\_\_\_ horas.

**Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para Inclusão *pós-mortem* em Projeto de Pesquisa****Declaração do responsável**

Eu, \_\_\_\_\_, com 18 anos de idade ou mais, em pleno gozo das minhas faculdades mentais, autorizo a inclusão *pos mortem* do paciente \_\_\_\_\_ na pesquisa “**Detecção rápida da citocina IL-6 para identificação da LV grave**”.

As implicações desta participação, incluindo a natureza, duração e objetivo do estudo, os métodos e meios através dos quais ele será conduzido foram explicados a mim. Tive a oportunidade de esclarecer todas as dúvidas que eu tinha a respeito do estudo. Estou de acordo de que uma amostra do sangue seja armazenada para pesquisas futuras e que uma amostra do sangue do baço seja colhida agora para exames. Entendo que em qualquer momento posso retirar essa participação no estudo sem sofrer nenhuma punição ou perda de meus direitos. Eu recebi uma cópia deste termo de consentimento.

\_\_\_\_\_  
Nome do paciente\_\_\_\_\_  
Assinatura ou impressão digital do responsável

Data \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ às \_\_\_\_\_ horas

**Declaração da testemunha:**

Eu presenciei a explicação acima descrita, posso confirmar a oportunidade concedida ao voluntário de fazer perguntas e a assinatura do mesmo.

\_\_\_\_\_  
Nome da testemunha\_\_\_\_\_  
Assinatura ou impressão digital da testemunha

Data \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ às \_\_\_\_\_ horas

**Declaração do investigador:**

Eu expliquei o objetivo deste estudo ao voluntário. No melhor do meu conhecimento, ele entendeu o objetivo, procedimentos, riscos e benefícios deste estudo. Declaro também que o responsável paciente recebeu uma cópia do termo de consentimento.

\_\_\_\_\_  
Nome do investigador\_\_\_\_\_  
Assinatura do investigador

Data \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ às \_\_\_\_\_ horas.

APÊNDICE 7: Questionário estruturado para enformações clínicas

“Detecção rápida da citocina IL-6 para identificação da LV grave”.

1. IDENTIFICAÇÃO

Nº. do paciente no estudo: DLC-\_\_\_\_\_. Número do prontuário no IDTNP: \_\_\_\_\_

Nome:\_\_\_\_\_ Sexo: \_\_\_M \_\_\_F

Data do nascimento:\_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ Data da admissão: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ Data da alta: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

Procedência (UF) : \_\_\_\_\_ Município : \_\_\_\_\_

2. HISTÓRIA CLÍNICA

Tempo de doença:\_\_\_\_\_ dias

Perda de peso..... ( ) 1. Sim 2. Não 9. Ignorado

Se sim, quantificar: \_\_\_\_\_ g

Febre..... ( ) 1. Sim 2. Não 9. Ignorado

Se sim duração da febre: \_\_\_\_\_ dias

Calafrios..... ( ) 1. Sim 2. Não 9. Ignorado

Palidez..... ( ) 1. Sim 2. Não 9. Ignorado

Apatia..... ( ) 1. Sim 2. Não 9. Ignorado

Agitação / irritabilidade..... ( ) 1. Sim 2. Não 9. Ignorado

Fadiga / astenia..... ( ) 1. Sim 2. Não 9. Ignorado

Vômitos..... ( ) 1. Sim 2. Não 9. Ignorado

Sonolência..... ( ) 1. Sim 2. Não 9. Ignorado

Insônia ..... ( ) 1. Sim 2. Não 9. Ignorado

Inapetência..... ( ) 1. Sim 2. Não 9. Ignorado

Aumento do volume abdominal..... ( ) 1. Sim 2. Não 9. Ignorado

Diarréia..... ( ) 1. Sim 2. Não 9. Ignorado

Constipação intestinal..... ( ) 1. Sim 2. Não 9. Ignorado

Dor abdominal..... ( ) 1. Sim 2. Não 9. Ignorado

Tosse..... ( ) 1. Sim 2. Não 9. Ignorado

Dispnéia..... ( ) 1. Sim 2. Não 9. Ignorado

Alteração da cor da urina..... ( ) 1. Sim 2. Não 9. Ignorado

Oligúria..... ( ) 1. Sim 2. Não 9. Ignorado

Queda de cabelo..... ( ) 1. Sim 2. Não 9. Ignorado

Edema..... ( ) 1. Sim 2. Não 9. Ignorado

Petéquias..... ( ) 1. Sim 2. Não 9. Ignorado

Equimoses..... ( ) 1. Sim 2. Não 9. Ignorado

Epistaxe..... ( ) 1. Sim 2. Não 9. Ignorado

Sangramento gengival..... ( ) 1. Sim 2. Não 9. Ignorado

Sangramento em locais de punção..... ( ) 1. Sim 2. Não 9. Ignorado

Sangramento digestivo..... ( ) 1. Sim 2. Não 9. Ignorado

Hematúria macroscópica..... ( ) 1. Sim 2. Não 9. Ignorado

### 3. EXAME FÍSICO

Peso: \_\_\_\_\_ kg Estatura: \_\_\_\_\_ cm PA: \_\_\_\_\_ x \_\_\_\_\_ mmHg FC: \_\_\_\_\_ bpm FR: \_\_\_\_\_ irpm

Temperatura axilar máxima durante a internação \_\_\_\_\_ °C

Estado geral ( ) 1. Bom 2. Regular 3. Comprometido

Consciente ( ) 1. Sim 2. Não 9. Ignorado

Cor das mucosas ( ) 1. Normocoradas 2. Palidez leve/moderada 3. Palidez acentuada

Icterícia ( ) 1. Sim 2. Não 9. Ignorado

Perfusão periférica ( ) 1. Boa 2. Cianose de extremidades 3. Cianose generalizada

Lesões de pele / Especificar ( ) 1. Sim 2. Não 9. Ignorado

Se sim, especificar (tipo da lesão, localização, tamanho, forma, contornos, ulceração, elevação, secreção)

Alopecia ( ) 1. Sim 2. Não 9. Ignorado

Linfonodomegalia ( ) 1. Ausente 2. Em 1-2 cadeias 3. Em mais de 3 cadeias

Hidratação ( ) 1. Hidratado 2. Desidratado I 3. Desidratado II 4. Desidratado III 9. Ignorado

Edema ( ) 1. Ausente 2. Edema de MMII 3. Edema generalizado

Estado nutricional: ( ) 1. Eutrófico 2. Desnutrido I 3. Desnutrido II 4. Desnutrido III 9. Ignorado

Dispneia ( ) 1. Sim 2. Não 9. Ignorado

Se sim, retrações intercostais ou subdiafragmáticas ( ) 1. Sim 2. Não 9. Ignorado

Ausculta pulmonar ( ) Normal ( ) Estertores crepitantes ( ) Estertores bolhosos

( ) Sibilos ( ) Roncos

Outras: \_\_\_\_\_

Ausculta cardíaca ( ) Normal ( ) Sopros ( ) Arritmia ( ) Ritmo de galope ( ) Frêmito

( ) Atrito pericárdico ( ) Abafamento de bulhas

( ) Outras: \_\_\_\_\_

Esplenomegalia ( ) 1. Sim 2. Não 9. Ignorado

Se sim, baço a \_\_\_\_\_ cm do BCE, na linha hemiclavicular, em direção à ponta

Hepatomegalia ( ) 1. Sim 2. Não 9. Ignorado

Se sim, fígado a \_\_\_\_\_ cm do BCD e \_\_\_\_\_ cm do apêndice xifóide

Diagnóstico anterior de LV: ( ) 1. Sim 2. Não 9. Ignorado Data: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

### 4. TERAPÊUTICA UTILIZADA 1. Sim 2. Não 9. Ignorado

Terapia de suporte:

( ) Antibióticos

( ) Concentrado de hemácias

( ) Concentrado de plaquetas

( ) Plasma

( ) Vitamina K

( ) Complexo protrombínico

Terapia específica

( ) Antimonial de N metil glucamina Data: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

( ) Desoxicolato de anfotericina B Data: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

( ) Anfotericina B lipossomal Data: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

( ) Miltefosina

( ) AAS ou terapia anticoagulante Data: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

( ) Outras: \_\_\_\_\_

5. COMPLICAÇÕES 1. Sim 2. Não 9. Ignorado

( ) Infecção urinária

( ) Insuficiência renal

( ) Pneumonia

( ) Infecção cutânea ou do tecido celular subcutâneo

( ) Sepsis

( ) Hemorragia

( ) Convulsões

( ) Outra: \_\_\_\_\_

6. CO-MORBIDADES 1. Sim 2. Não 9. Ignorado

( ) HIV / aids

( ) Uso de drogas imunossupressoras

( ) Câncer. Especificar: \_\_\_\_\_

( ) Transplante. Especificar: \_\_\_\_\_

( ) Doença renal crônica

( ) Doença hepática crônica

( ) Outra: \_\_\_\_\_

7. EVOLUÇÃO CLÍNICA

Número de dias de febre após o início da terapia específica: \_\_\_ dias

Tamanho do baço à saída do hospital: \_\_\_ cm do RCE

Tamanho do fígado à saída do hospital: \_\_\_ cm do RCD

( ) Alta hospitalar com melhora

( ) Alta hospitalar sem melhora

( ) Transferência para UTI

( ) Transferência para outro serviço

( ) Óbito

Em caso de óbito, data do óbito: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ Causa mortis: \_\_\_\_\_

Comentários: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Data	Valores normais	Dia 0	Dia ____	Dia ____	Dia ____
Hemácias	Homens: 4,3 a 5,7 x 10 <sup>6</sup> Mulheres e crianças: 3,9 a 5,3 x 10 <sup>6</sup>				
Hemoglobina	Homens: 13,50 a 18,00g/dL Mulheres e crianças: 12,00 a 16,40/dL				
Hematócrito	Homens: 40 a 54 % Mulheres e crianças: 36 a 47 %				
VCM	Normal: 76,0 – 96,0 $\mu^3$				
HCM	Normal: 27,0 – 32,0 $\mu^3$				
CHCM	Normal: 32,0 – 36,0 %				
Leucócitos	Criança: 4.000 a 10.000/mm <sup>3</sup> Adultos: 4.000 a 9.000/mm <sup>3</sup>				
Pro, meta e mielócitos	0%				
Bastonetes	1-5%				
Segmentados	Criança: 30 a 55% Adultos: 50 a 70%				
Eosinófilos	Criança: 1 a 5% Adultos: 1 a 4				
Basófilos	0-1%				
Linfócitos	Criança: 30 a 45% Adultos: 20 a 45%				
Monócitos	0-2 %				
Plaquetas	Criança: 150.000 a 430.000/mm <sup>3</sup> Adultos: 150.000 a 400.000/mm <sup>3</sup>				
VHS	<10				
AST (TGO)	Homens: <37U/I Mulheres: <31U/I				
ALT (TGP)	Homens: <40U/I Mulheres: <31U/I				
Fosfatase alcalina	Crianças: 27 a 215 U/dL Adultos: 27 a 100 U/dL				
Bil. Direta	Até 0,4 mg/dL				
Bil. Indireta	Até 0,8 mg/dL				
Creatinina	0,4 – 1,3 mg/dL				
Uréia	15 a 45 mg/dL				
<i>Leishmania</i> na MO	Ausente				
Sorologia p/ <i>Leishmania</i>	Não reagente				
Cultura p/ <i>Leishmania</i>	Sem crescimento				
Teste HIV	Não reagente				
Proteínas Totais	6,0 a 8,0 g/dL				
Albumina	3,5 a 5,5 g/dL				
Globulinas	2,0 a 3,2 g/dL				
<b>Coagulograma</b>					
Tempo sangramento	1-4 min				
Tempo coagulação	Até 12 min				
TAP	70-100%				
INR	0,91 – 1,25				
<b>Exame de Urina</b>					
Proteínas	Ausente				
Hg/hemácias	Ausente				
Cilindros	Ausente				
Piócitos	Até 5 por campo-				
<b>Exame de fezes</b>					
Parasitológico	Negativo				
<b>Radiologia</b>					
Rx Tórax					
<b>Culturas</b>					

