



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PARASITOLOGIA



Proteoma Quantitativo para Identificação de Potenciais Fatores de Virulência em *Leishmania infantum*

Luiz Carlos Fialho Júnior

Belo Horizonte
2017



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PARASITOLOGIA



Proteoma Quantitativo para Identificação de Potenciais Fatores de Virulência em *Leishmania infantum*

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Parasitologia.

Área de concentração: Protozoologia

Orientadora: Prof. Dra. Hélida Monteiro de Andrade

Co-orientadora: Dra Simone da Fonseca Pires

Belo Horizonte
2017

“Não é merecedor do favo de mel
aquele que evita a colmeia porque as
abelhas têm ferrões.”

- *William Shakespeare*

AGRADECIMENTOS

- Primeiramente agradeço a Deus por tudo.
- Ao meu pai Luiz Carlos e minha mãe Carla, que sempre me incentivaram, me deram força e base para ser o que sou hoje. Agradeço todo o amor e zelo que tive por toda a vida.
- À Tarcila, meu amor, pelo companheirismo, amor e amizade, me ajudando a superar as dificuldades, me incentivando e me tornando uma pessoa melhor a cada dia. Obrigado pelo apoio incondicional. Te amo demais!
- Aos meus familiares e amigos, sou uma pessoa de sorte por ter vocês.
- À minha orientadora, Prof. Dra. Héli da Andrade, que me ensinou tudo que sei profissionalmente. Agradeço a paciência em todos esses anos de laboratório. Agradeço também a oportunidade de trabalhar no ótimo ambiente em que você proporciona para as pessoas que nele convivem. Obrigado pelo enorme carinho que tem por mim, saiba que é recíproco!
- À minha co-orientadora Dra. Simone Pires, pelas inúmeras ajudas nos experimentos, além da enorme paciência.
- Aos meus amigos do laboratório: Angélica, Jordana, Ivana, Thaisa, Gabi, Lívia, João Carlos, Elaine, Bruna e Ramon, obrigado pela ótima convivência.
- Ao Prof. Dr. Richard Burchmore e os membros do laboratório Glasgow Polyomics, da Universidade de Glasgow, que me receberam muito bem durante o período de doutorado sanduíche e me ajudaram a obter bastante dado para o trabalho.
- Ao Prof. Dr. Jeronimo Ruiz e os alunos do laboratório de Informática de Biosistemas, pela ajuda com as análises dos dados.
- Ao Programa de Pós-Graduação em Parasitologia da UFMG.
- A todos os funcionários, professores e alunos do Departamento de Parasitologia da UFMG.
- Às agências financiadoras CNPq e CAPES.

Resumo

Leishmania infantum é o protozoário responsável pela Leishmaniose Visceral nas Américas e na Europa, uma doença grave, podendo ser fatal se não tratada. Os casos humanos variam de infecção subclínica, com um número indeterminado de assintomáticos em áreas endêmicas, a um quadro crescente e de alta letalidade em crianças. Em cães infectados, menos de 50% apresentam sinais clínicos da doença, no entanto, alguns sucumbem em poucos meses após a infecção. Essa ampla diversidade clínica em humanos e em caninos sugere que fatores tanto do hospedeiro quanto do parasito podem estar envolvidos na variabilidade da doença. Assim, devido a sua importância e diversidade clínico-epidemiológica em nosso país, o estudo de fatores de virulência em *L. infantum* se mostra bastante promissor para o entendimento da relação parasito-hospedeiro. Em um estudo anterior foi caracterizada a virulência de duas cepas (BH46 e BH400) de *L. infantum*, e foi observado uma maior virulência e infectividade da cepa BH400. Além disso, através da análise proteômica da forma promastigota, um total de 63 spots foram identificados correspondendo a 36 proteínas das quais, 16 já haviam sido previamente associados à virulência de *Leishmania* spp. Dando continuidade a essa linha de pesquisa, no presente estudo incluímos as formas amastigotas axênicas e esplênicas com o objetivo comparar a abundância diferencial de proteínas entre as cepas BH46 e BH400. Para isso, foram utilizadas duas técnicas de proteômica quantitativa: marcação por fluoróforo (DIGE) e marcação por isóbaros (TMT), seguidas de identificação por Espectrometria de Massas. Foram identificadas um total de 414 proteínas únicas que apresentaram diferença de abundância, sendo 68,4% encontradas na técnica TMT, 19% no DIGE e 12,6% em ambas as técnicas. Na forma Promastigota, foi observado um total de 270 proteínas com diferença de abundância entre as cepas. Também foram encontradas 302 e 293 proteínas diferencialmente abundantes entre as cepas nas formas Amastigota Axênica e em Amastigota Esplênica, respectivamente. Na cepa BH400, foi observado 117 proteínas com aumento de abundância em Amastigota Esplênica, enquanto 79 proteínas apresentavam diminuição. Por outro lado, em Amastigota Axênica foi observado uma maior quantidade de proteínas com abundância diminuída (178) enquanto 66 proteínas apresentaram aumento de abundância. Em Promastigota de BH400 a quantidade de proteínas com abundância aumentada (114) e diminuída (115) foi similar. A predição de interação entre as proteínas identificadas em cada forma apontou as proteínas relacionadas com tradução e proteínas de resposta ao estresse oxidativo como importantes redes. Dentre todas as proteínas com diferença de abundância, foi observado que na forma Amastigotas Axênicas, nenhum processo biológico estava enriquecido, mas simultaneamente nas formas Promastigota e Amastigota Esplênica da cepa 400 (mais virulenta) estavam enriquecidos os processos metabólicos: Celular, de Ácido Carboxílico, de Substância Orgânica, e Processo de Resposta ao Estresse. Além desses, nas formas promastigotas de 400, estavam também enriquecidos os Processos Metabólico Primário e de Biossíntese Celular. Por outro lado, simultaneamente nas formas promastigotas e amastigotas esplênicas da cepa BH46 foi observado enriquecimento do processo de biossíntese de compostos

nitrogenados, enquanto nas formas amastigotas esplênicas dessa cepa estavam enriquecidos também os processos de biossíntese celular, expressão gênica e tradução. Foi observado que 14 proteínas estavam simultaneamente aumentadas em pelo menos duas formas evolutivas da cepa 400, sendo 8 delas em promastigota e amastigota esplênica, 5 em promastigota e amastigota axênica e 1 nas formas amastigotas (axênica e esplênica). Da mesma forma, 20 proteínas estavam com abundância diminuída simultaneamente em duas formas da cepa 400, sendo, 6 em promastigota e amastigota esplênica, 2 em promastigota e amastigota axênica e 12 nas formas amastigotas (axênica e esplênica). Por fim, foi observado uma maior semelhança entre a abundância das proteínas em Promastigota e Amastigota Axênica do que em Amastigota Esplênica, independente da cepa. Os resultados alcançados contribuem para o avanço no conhecimento da biologia de *L. infantum*, e muitas das proteínas identificadas são promissoras para o melhor entendimento da relação parasito-hospedeiro nessa espécie, principalmente no estudo de fatores de virulência.

Abstract

Leishmania infantum is the protozoan responsible for Visceral *Leishmaniasis* in Americas and Europe, a serious disease that can be fatal if untreated. Human cases range from subclinical infection, with an undetermined number of asymptomatic in endemic areas, to a growing and highly lethal in children. In infected dogs, less than 50% have clinical signs of the disease, however, some succumb within a few months after infection. This clinical signs diversity in humans and canines *suggests* that both host and parasite factors may be involved in disease variability. Thus, due to its importance and clinical-epidemiological diversity in our country, the study of virulence factors in *L. infantum* is very promising for the understanding of the parasite-host relationship. In a previous study the virulence of two strains (BH46 and BH400) of *L. infantum* was characterized, and a higher virulence and infectivity of strain BH400 was observed. In addition, through proteomic analysis of the promastigote form, a total of 63 spots were identified corresponding to 36 proteins of which 16 had previously been associated with the virulence of *Leishmania* spp. Continuing this line of research, in the present study we included the axenic and splenic amastigote forms of both strains with the objective of comparing the differential abundance of proteins between strains BH46 and BH400. Two quantitative proteomics techniques were used: fluorescent labeling (DIGE) and isobaric labeling (TMT) followed by identification by mass spectrometer. A total of 414 unique proteins that showed differences on abundance were identified, being 68.4% found in the TMT technique, 19.1% in DIGE and 12.6% in both techniques. In Promastigote form, a total of 270 proteins with a difference of abundance between the strains were observed. We also found 302 and 293 differential abundant proteins among the strains in the Axenic Amastigote and in the Splenic Amastigote, respectively. In the BH400 strain, 117 proteins with increased abundance were observed in Splenic Amastigote, while 79 proteins showed decrease. On the other hand, in Axenic Amastigote was observed a greater amount of proteins with abundance diminished (178) while 66 proteins presented increase of abundance. In Promastigote of BH400 the amount of proteins with increased (114) and decreased (115) abundance was similar. The interaction prediction of the proteins identified in each form, demonstrate translation-related proteins and response to oxidative stress-related proteins, as important networks. Among all proteins with a difference of abundance, it was observed that in Axenic Amastigotes form, none biological process was enriched, but simultaneously in the Promastigota and Splenic Amastigote forms of BH400 strain (more virulent) were enriched the metabolic processes: Cellular, Carboxylic Acid, of Organic Substance, and Response to Stress. Furthermore, in the promastigote form of BH400, the Primary Metabolic and Cell Biosynthesis Processes were also enriched. On the other hand, in promastigotes and splenic amastigotes forms of the BH46 strain, the enrichment of the biosynthesis process of nitrogenous compounds was observed, whereas in amastigote forms, the cellular biosynthesis process, gene expression and translation were enriched. It was observed that 14 proteins were simultaneously increased in at least two evolutionary forms of BH400 strain, 8 in promastigote and splenic amastigote, 5 in promastigotes and axenic amastigotes and 1 in amastigotes

(axenic and splenic) forms. Also, 20 proteins were simultaneously decreased in two evolutive forms of BH400, 6 of them in promastigote and splenic amastigote, 2 in axenic amastigote and promastigote and 12 in both amastigote forms (axenic and splenic). Finally, a greater similarity between the abundance of the proteins in Promastigote and Axenic Amastigote was observed than in Splenic Amastigote, independently of the strain. The results obtained contribute to the advances in the knowledge of the biology of *L. infantum*, and many of the identified proteins are promising for a better understanding of the parasite-host relationship in this species, especially in virulence factors study.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Esquema da análise das imagens obtidas dos géis fluorescentes utilizando o software DeCyder™ 2-D <i>Differential Analysis Software</i> v7.2 (GE Healthcare).....	36
Figura 2: Definição dos parâmetros utilizados na seleção dos <i>spots</i> . Área: área expressa em pixels dentro de um <i>spot</i> delimitado. Inclinação (Slope): Medida dos atributos tridimensionais do <i>spot</i>	37
Figura 3: Curva de crescimento das cepas BH46 e BH400 de <i>L. infantum</i> na forma Promastigota em meio α - MEM completo.	43
Figura 4: Representação dos géis bidimensionais com 600 μ g de proteína de <i>L. infantum</i> das cepas BH 46 (direita) e BH400 (esquerda) em <i>strips</i> de 18 cm, pH 4-7 SDS-PAGE a 12%, corados por Coomassie Brilliant Blue G-250. (A) Promastigota; (B) Amastigota Axênica; (C) Amastigota Esplênica.	45
Figura 5: <i>Scatter Plot</i> representando (eixo X) a relação entre os valores de % de volume de cada <i>spot</i> com os valores (eixo Y) de % de volume do gel usado como referência para a comparação. Corr: Índice de Correlação; Count: Quantidade de <i>match</i> entre os géis. (A) Promastigota; (B) Amastigota Axênica; (C) Amastigota Esplênica.....	46
Figura 6: Imagem representativa dos Géis DIGE das cepas BH46 e BH400 de <i>L. infantum</i> , a partir de <i>strips</i> de 18 cm, pH 4 – 7 contendo 50 μ g de proteína de cada amostra previamente marcadas com os fluoróforos. O gel em preto e branco ao centro representa o perfil proteico de cada amostra. As imagens azuis e vermelhas representam a amostra marcada com os fluoróforos Cy3 e Cy5, respectivamente.....	48
Figura 7: Imagem representativa de um dos <i>spots</i> com diferença de abundância entre na cepa BH46 (A) em relação ao mesmo <i>spot</i> na cepa BH400 (B) e a representação tridimensional do respectivo <i>spot</i> nas cepas BH46 (C) e BH400 (D).....	49
Figura 8: “Heat map” e agrupamento hierárquico dos dados do 2D-DIGE. Foi realizado o agrupamento hierárquico (<i>Pattern Analysis</i>) das 3 formas evolutivas das cepas BH46 e BH400 com base no padrão de <i>spots</i> globais marcados pelo DIGE. Os valores de expressão relativa estão exibidos na escala colorimétrica usando o log de abundância padronizado, variando de -1 (regulado-negativamente; verde) para 1 (regulado-positivamente; vermelho). As cepas são mostradas no eixo horizontal e os <i>spots</i> são mostrados no eixo vertical.....	50
Figura 9: Agrupamento hierárquico (<i>Pattern Analysis</i>) dos <i>spots</i> selecionados por diferença de intensidade na comparação entre as cepas BH400 e BH46. Os valores de expressão relativa estão exibidos na escala colorimétrica usando o log de abundância padronizado, variando de -1	

(regulado-negativamente; verde) para 1 (regulado-positivamente; vermelho). As cepas são mostradas no eixo horizontal e os spots são mostrados no eixo vertical.....	51
Figura 10: Imagem representativa dos geis 2DE mostrando os Spots selecionados através de One-Way ANOVA ($P \leq 0,05$) como diferencialmente abundantes ($\text{Fold Change} \geq 2$) entre as cepas BH46 e BH400 de <i>L. infantum</i> nas formas Promastigotas (A), Amastigotas Axênicas (B) e Amastigotas Esplênicas (C). Foram utilizadas strips de 18cm, pH 4 – 7. Cada spot recebeu um número de identificação único.	52
Figura 11: Gráfico representativo do total de proteínas únicas com diferença de abundância entre as amostras estudadas. Amostras foram marcadas com DIGE e TMT e identificadas por Espectrometria de Massa do tipo MALDI e LC-MS/MS, respectivamente. Em azul, promastigota; Verde, Amastigota Axênica e Marrom, Amastigota Esplênica.....	56
Figura 12: Diagrama de Venn representativo da complementariedade das técnicas de TMT e DIGE. São mostrados os números totais de proteínas identificadas em cada técnica bem como as encontradas simultaneamente por ambas as técnicas.	57
Figura 13: Gráfico de dispersão da abundância global das proteínas identificadas na forma Promastigota. Valores de $\text{Fold Change} \leq 0,5$ = Abundância Diminuída; $\text{Fold Change} \geq 2$ = Abundância Aumentada; $\text{Fold Change } 0,6 \sim 1,9$ = Sem Alteração. Valor de $P \leq 0,05$	58
Figura 14: Diagramas de Venn representando o número de proteínas identificadas com (A) abundância diminuída e (B) abundância aumentada na forma Promastigota das cepas BH46 e BH400 de <i>L. infantum</i>	59
Figura 15: Categorização Funcional das proteínas da forma Promastigota, diminuídas em BH46 (A), aumentadas em BH46 (B), diminuídas em BH400 (C) e aumentadas em BH400 (D).....	68
Figura 16: Predição de interação das proteínas identificadas que apresentaram diferença na abundância na forma Promastigota da cepa BH46. Os valores de abundância relativa estão exibidos na escala colorimétrica usando o log de abundância padronizado, variando de -1 (regulado negativamente; vermelho) para 1 (regulado positivamente; verde). As proteínas destacadas em azul, são proteínas pertencentes ao processo biológico de Resposta ao Estresse, de acordo com o Gene Ontology. São elas: 1- S-adenosilhomocisteína hidrolase; 2- Piruvato Desidrogenase E1 subunidade beta; 3- Glutathione Peroxidase-like; 4- Superóxido Dismutase de ferro; 5- Citocromo C. Em laranja observa-se um agrupamento de proteínas ribossomais e reguladoras da tradução que se interagem.....	70
Figura 17: Predição de interação das proteínas identificadas que apresentaram diferença na abundância na forma Promastigota da cepa BH400. Os valores de abundância relativa estão exibidos na escala colorimétrica usando o log de abundância padronizado, variando de -1 (regulado negativamente; vermelho) para 1 (regulado positivamente; verde). As proteínas destacadas em azul, são proteínas pertencentes ao processo biológico de Resposta ao Estresse, de acordo com o Gene Ontology. São elas: 1- NADH-Citocromo b5 Redutase; 2- NADP-	

desidrogenase álcool dependente; 3- Dihidrolipoamido desidrogenase; 4-: S-adenosilhomocisteína hidrolase; 5- Citochrome C; 6- Proteína Precursora de Ferro-Enxofre Reiske. Destacados em laranja: 1- Agrupamento de proteínas ribossomais e reguladoras da tradução que se interagem; 2- Proteínas que participam do complexo do Proteasoma.....	71
Figura 18: Processos Biológicos Enriquecidos das proteínas diferencialmente abundantes na forma Promastigota das cepas BH46 e BH400 de <i>L. infantum</i> . Foi utilizado a ferramenta BINGO implementado no programa Cytoscape 3.4.0. Foram considerados significativos os processos biológicos com valor de P-corrigido menor que 0,05.	72
Figura 19: Gráfico de dispersão da abundância global das proteínas identificadas na forma Amastigota Axênica. Valores de Fold Change $\leq 0,5$ = Abundância Diminuída; Fold Change ≥ 2 = Abundância Aumentada; Fold Change $0,6 \sim 1,9$ = Sem Alteração.	73
Figura 20: Diagramas de Venn representando o número de proteínas identificadas com (A) abundância diminuída e (B) abundância aumentada na forma Amastigota Axênica das cepas BH46 e BH400 de <i>L. infantum</i>	74
Figura 21: Categorização Funcional das proteínas da forma Amastigota Axênica, diminuídas em BH46 (A), aumentadas em BH46 (B), diminuídas em BH400 (C) e aumentadas em BH400 (D).	82
Figura 23: Predição de interação das proteínas identificadas que apresentaram diferença na abundância na forma Amastigota Axênica da cepa BH400. Os valores de abundância relativa estão exibidos na escala colorimétrica usando o log de abundância padronizado, variando de -1 (regulado negativamente; vermelho) para 1 (regulado positivamente; verde). As proteínas destacadas em azul, são proteínas pertencentes ao processo biológico de Resposta ao Estresse, de acordo com o Gene Ontology. São elas: 1- Glutamato Desidrogenase; 2- D-isomero 2-ácido-hidroxi desidrogenase; 3- Proteína Conservada Hipotética LinJ.23.1680; 4- Glicosomal malato desidrogenase; 5- Peptidase mitocondrial, subunidade beta, Metallo-peptidase, Clan ME, Família M16; 6- Fumarato redutase dependente de NADH; 7- Poliprenol redutase. Destacado em laranja observa-se um agrupamento de proteínas ribossomais e reguladoras da tradução que se interagem.....	84
Figura 24: Gráfico de dispersão da abundância global das proteínas identificadas na forma Amastigota Esplênica. Valores de Fold Change $\leq 0,5$ = Abundância Diminuída; Fold Change ≥ 2 = Abundância Aumentada; Fold Change $0,6 \sim 1,9$ = Sem Alteração.	85
Figura 25: Diagrama de Venn representando o número de proteínas identificadas com (A) abundância diminuída nas cepas e (B) abundância aumentada nas cepas na forma Amastigota Esplênica.	86
Figura 26: Categorização Funcional das proteínas da forma Amastigota Esplênica, diminuídas em BH46 (A), aumentadas em BH46 (B), diminuídas em BH400 (C) e aumentadas em BH400 (D).	94

Figura 27: Predição de interação das proteínas identificadas que apresentaram diferença na abundância na forma Amastigota Esplênica da cepa BH46. Os valores de abundância relativa estão exibidos na escala colorimétrica usando o log de abundância padronizado, variando de -1 (regulado negativamente; vermelho) para 1 (regulado positivamente; verde). As proteínas destacadas em azul, são proteínas pertencentes ao processo biológico de Resposta ao Estresse, de acordo com o Gene Ontology. São elas: 1- oxidoredutase; 2- 1,2-Dihidroxi-3-keto-5-metiltiopenteno dioxigenase; 3- Proteína de Choque Térmico; 4- Fumarato redutase dependente de NADH; 5- Malato Desidrogenase mitocondrial; 6- Malato Desidrogenase; 7- Piruvato desidrogenase E1 subunidade beta; 8- 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA redutase; 9- Superóxido Dismutase de Ferro. Destacado em laranja observa-se um agrupamento de proteínas ribossomais e reguladoras da tradução que se interagem. 96

Figura 28: Predição de interação das proteínas identificadas que apresentaram diferença na abundância na forma Amastigota Esplênica da cepa BH400. Os valores de abundância relativa estão exibidos na escala colorimétrica usando o log de abundância padronizado, variando de -1 (regulado negativamente; vermelho) para 1 (regulado positivamente; verde). As proteínas destacadas em azul, são proteínas pertencentes ao processo biológico de Resposta ao Estresse, de acordo com o Gene Ontology. São elas: 1- Piruvato desidrogenase E1 subunidade alpha; 2- Malato Desidrogenase; 3- Mitocondrial Malato Desidrogenase; 4- 1,2-Dihidroxi-3-keto-5-metiltiopenteno dioxigenase; 5- D-isômero 2-ácido-hidroxi desidrogenase; 6- Oxidoredutase; 7- Proteína de Choque Térmico; 8- 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA redutase. Destacados em laranja: 1- Interações de Proteínas relacionadas com a via metabólica; 2- Agrupamento de proteínas ribossomais e reguladoras da tradução que se interagem. 97

Figura 29: Processos Biológicos Enriquecidos das proteínas diferencialmente expressas na forma Amastigota Esplênica. 98

Figura 30: Diagrama de Venn das proteínas com abundância aumentada na cepa BH400 nas três formas evolutivas. As proteínas presentes em pelo menos duas formas evolutivas (interseções) estão demonstradas nos quadros. As proteínas encontradas especificamente em cada forma evolutiva estão descritas no Apêndice 2. 100

Figura 31: Diagrama de Venn das proteínas com abundância diminuída na cepa BH400 nas três formas evolutivas. As proteínas presentes em pelo menos duas formas evolutivas (interseções) estão demonstradas nos quadros. As proteínas encontradas especificamente em cada forma evolutiva estão descritas no Apêndice 3. 101

Figura 32: Representação colorimétrica dos valores de abundância das proteínas identificadas com diferenças de expressão entre as amostras. Os valores de abundância estão exibidos na escala colorimétrica usando o log de abundância padronizado, variando de -1 (regulado-negativamente; vermelho) para 1 (regulado-positivamente; verde). Pro = Promastigota; AA = Amastigota Axênica; AE = Amastigota Esplênica. 102

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2-DE – Eletroforese Bidimensional.

α -MEM – Meio mínimo Essencial.

AA – Amastigota Axênica

AE – Amastigota Esplênica

BVA – Análise de Variação Biológica (Biological Variation Analysis).

CETEA – Comitê de Ética em Experimentação Animal.

CHAPS – 3-[(3-cholamidopropil) dimetilamonio]-2-hidroxi-1-propanesulfonato.

DIGE – Gel de Eletroforese Diferencial (Differential Gel Electrophoresis).

DIA – Análise Diferencial no gel (Differential in-gel Analysis).

DTT – Ditionitreitol.

EDA – Análise de Dados Estendido (Extended Data Analysis).

FunCat – Catálogo Funcional (Functional Catalogue)

GI – Identificador GenInfo.

GILPS – Glicoinositolfosfolipídeos

GO – Gene Ontology

HSP-70 – Proteína do Choque Térmico – 70

IAA – Iodoacetamida.

ICAT – Isotope Coded Affinity Tag.

IEF – Focalização Isoelétrica.

IPG – Gradiente de pH Imobilizado (Immobilized pH Gradient).

KMP-11 – Proteína de Membrana de Kinetoplastídeos 11 kDa

LC-MS/MS – Cromatografia Líquida acoplada a um Espectrômetro de Massa em Tandem

LPG – Lipofosfoglicano.

LV – Leishmaniose Visceral.

pI – Ponto Isoelétrico

MALDI – Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization.

MM – Massa Molecular

MSP – Major Surface Protease.

NN-LIT – Meio Bifásico Liver Infusion Tryptose.

NO – Óxido Nítrico

PBH – Prefeitura de Belo Horizonte.

PPG – Proteofosfoglicanos

PRO - Promastigota

ROI – Reativos de Oxigênio

SDS-PAGE – Eletroforese em Gel de Poliacrilamida com Dodecil Sulfato de Sódio.

TMT – Tandem Mass Tag

ToF/ToF – Tempo de voo (Time of Flight).

WHO – Organização Mundial da Saúde.

Sumário

1. INTRODUÇÃO	17
1.1 <i>Leishmania</i> e Leishmanioses	17
1.2 Proteoma em <i>Leishmania</i>	20
1.3 Virulência em <i>Leishmania</i>	26
2. JUSTIFICATIVA	29
3. OBJETIVOS	30
3.1 Objetivo geral	30
3.2 Objetivos específicos	30
4. MATERIAIS E MÉTODOS	31
4.1 Material Biológico	31
4.1.1 Promastigotas	31
4.1.2 Amastigotas Axênicas	32
4.1.3 Amastigotas Esplênicas	32
4.2 Análise proteômica	33
4.2.1 Obtenção das proteínas	33
4.2.2 Eletroforese Bidimensional (2-DE)	33
4.2.3 Differential Gel Electrophoresis (DIGE)	34
4.2.3.1 Análise dos géis	36
4.2.4 Espectrometria de Massa: MALDI-ToF/ToF	39
4.2.5 Marcação Isobárica - <i>Tandem Mass Tag</i> (TMT)	40
4.2.6 Espectrometria de Massa: Orbitrap Q-Exactive (LC-MS/MS)	40
4.3 Organização e Análise dos Dados Proteômicos	40
5 RESULTADOS	43
5.1 Material Biológico	43
5.2. Análise Proteômica	44
5.2.1 Eletroforese Bidimensional (2-DE)	44
5.2.2 Differential Gel Electrophoresis (DIGE)	47
5.2.3 Identificação das Proteínas	53
5.2.3.1 Differential Gel Electrophoresis (DIGE)	53
5.2.3.2 Tandem Mass Tag (TMT)	54
5.3 Proteínas Diferencialmente Abundantes (DIGE + TMT)	55
5.4 Análise Comparativa	56
5.4.1 Promastigotas	57
5.4.2 Amastigotas Axênicas	73

5.4.3 Amastigotas Esplênicas	85
5.5 Análise Comparativa entre as Formas Evolutivas.....	99
6 DISCUSSÃO.....	104
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	114
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	115
9 APÊNDICES	133
Apêndice 1.....	133
Apêndice 2.....	141
Apêndice 3.....	149
Apêndice 4.....	157
Apêndice 5.....	159
Apêndice 6.....	163

1. INTRODUÇÃO

1.1 *Leishmania* e Leishmanioses

O gênero *Leishmania* (Ross, 1903), pertence à família Trypanosomatidae, ordem Kinetoplastida, Classe Zoomastigophora, Sub-Filo Mastigophora, Filo Sarcomastigophora. São protozoários transmitidos através da picada de flebotomíneos fêmeas do gênero *Phlebotomus* no Velho Mundo (Europa, Ásia e África) e *Lutzomyia* no Novo Mundo (Américas) (Neuber, 2008). Apresentam ciclo de vida heteroxênico, sendo que as formas promastigotas são flageladas livres ou estão aderidas ao trato digestivo dos hospedeiros invertebrados. Enquanto as formas amastigotas possuem flagelo retraído e são intracelulares obrigatórias no hospedeiro vertebrado (McNicoll, 2006).

O parasito é transmitido durante a telmofagia do flebotomíneo fêmea infectado, na qual a forma flagelada promastigota metacíclica é regurgitada, infectando o hospedeiro vertebrado. Essas promastigotas são fagocitadas por células do sistema mononuclear fagocitário e, dentro do vacúolo parasitóforo, passam por mudanças morfológicas, fisiológicas e bioquímicas e se diferenciam em formas arredondadas com flagelo retraído, denominadas amastigotas. Em seguida, ocorre a fusão do vacúolo parasitóforo com os lisossomos, dando origem ao vacúolo fagolisossomal, onde o parasito permanece em um ambiente hostil, contendo enzimas lisossomais, metabólitos reativos do oxigênio, mecanismos de sinalização celular, citocinas e produção de óxido nítrico (Cunningham, 2002). No entanto, a *Leishmania* está adaptada para sobreviver neste ambiente, sendo capaz de inibir diversos mecanismos de defesa celular responsáveis por causar a destruição do parasito, e então se multiplicar por divisão binária, até levar a ruptura da célula infectada e liberar formas amastigotas que são fagocitadas por outros macrófagos (Peters, 2008).

O inseto vetor se infecta através da ingestão de macrófagos contendo formas amastigotas que acompanham o sangue e tecido do hospedeiro vertebrado infectado. No trato digestivo anterior do flebotomíneo, as amastigotas transformam-se rapidamente em promastigotas, que se multiplicam, aderidas à parede do intestino e colonizam o trato digestivo do inseto. Em seguida, os parasitos migram para a região anterior do intestino onde uma parte deles se transformam em promastigotas metacíclicas, formas infectantes

para o hospedeiro vertebrado (Lainson *et al*, 1977; Sacks & Noben-Trauth, 2002; Bates *et al*, 2007).

Protozoários do gênero *Leishmania* são agentes etiológicos de um complexo de doenças que possuem um amplo espectro de sinais clínicos, variando desde lesões cutâneas que podem ser auto-limitantes até a visceralização, muitas vezes fatal se não tratada adequadamente. Essas doenças estão presentes em 98 países com aproximadamente 12 milhões de infectados e 350 milhões de pessoas em risco de contrair a infecção (<http://www.who.int/Leishmaniasis/en/> e <http://www.dndi.org/diseases-projects/diseases/vl>). No Brasil, o agente etiológico da leishmaniose visceral (LV), forma mais grave da doença, é a *Leishmania (Leishmania) infantum* (= *L. (L.) chagasi*).

No homem, a progressão da doença é determinada pela espécie do parasito, da cepa, da resposta imune e estado nutricional do hospedeiro. Essa variação de sinais clínicos pode ser dividida basicamente em duas doenças distintas: leishmaniose tegumentar e leishmaniose visceral. A forma tegumentar pode ser subdividida em cutânea (associada frequentemente às espécies *Leishmania (Leishmania) major*, *L. (L) tropica*, *L. (L) mexicana* e *L. (Viannia) braziliensis*), mucocutânea (associada principalmente por *L. (V) braziliensis* e *L. (L) tropica*) e difusa (associada a *L. (L) amazonensis*, *L. (V) guyanensis* e *L. (L) aethiopica*); enquanto a forma visceral, pode ser causada por *L. (L) donovani* ou por *L. (L.) infantum* (= *L. (L.) chagasi*) (Silveira *et al*, 2004, Castellano, 2005).

Destacamos que a leishmaniose visceral (LV) é a forma mais grave da doença, sendo causada por parasitos do complexo *Leishmania donovani* na África, Ásia, Europa e nas Américas (Gontijo e Melo, 2004). No Leste Africano e na Ásia, a doença é uma antroponose causada pela espécie *L. (L) donovani*. Nas Américas e na Europa, a espécie responsável pela doença é a *L. (L.) infantum/chagasi* e diferente da *L. (L) donovani*, essas espécies são responsáveis por causar zoonose (Gontijo e Melo, 2004; Chappuis, 2007).

A classificação taxonômica de *Leishmania* agrupa dois subgêneros: *Viannia* e *Leishmania*, e essa classificação baseia-se em aspectos biológicos, bioquímicos e moleculares. Os parasitos do subgênero *Viannia*, desenvolvem-se no intestino posterior do vetor, aderidos à parede. Por outro lado, os parasitos do subgênero *Leishmania* se desenvolvem no intestino médio e anterior do flebotomíneo (Lainson e Shaw, 1979).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (WHO) ocorrem 500.000 novos casos por ano de LV, sendo que a forma causada por *L. (L.) infantum*, representa 20% da

leishmaniose visceral humana mundial (100.000 casos anualmente) e sua incidência é crescente nas áreas urbanas e peri-urbanas dos trópicos (WHO, 2009).

Dentre os países acometidos pelas Leishmanioses, cinco merecem atenção especial por representarem cerca de 90% dos casos de leishmaniose visceral: Bangladesh, Índia, Nepal, Sudão, Venezuela e Brasil. Do Brasil são procedentes cerca de 97% dos casos humanos de LV descritos na América do Sul (<http://www.who.int/>), onde há um crescente aumento tanto das áreas de ocorrência quanto do número de casos. A região metropolitana de Belo Horizonte, nos últimos anos, registrou um aumento nos casos de LV, sugerindo um aumento na taxa de transmissão da doença. Entre 1994 a 2009, foram confirmados 1.215 casos de LV no município de Belo Horizonte. As taxas de letalidade são altas (a média dos últimos 11 anos é de 13%), tendo sido 19,3% em 2009 (PBH).

No homem, a LV acomete frequentemente crianças, idosos e pode ser considerada uma doença oportunista em pacientes portadores do vírus HIV, ou sob tratamentos com imunossupressores, indicativo de que o estado imune do hospedeiro é importante fator na infecção por *L. (L.) infantum* (Oliveira *et al*, 2008).

Em cães, a forma assintomática da doença apresenta índices entre 40 e 60% dos casos, o que dificulta muito o diagnóstico, sendo consequentemente, um fator determinante na disseminação, prejudicando o controle da doença. Na região endêmica de Belo Horizonte, MG, estudos demonstram uma correlação entre a LV canina e a humana, com os casos caninos antecedendo os casos humanos (Souza *et al*, 2005).

O desenvolvimento da doença não é influenciado pelo sexo ou a raça do hospedeiro, porém em relação à idade, observa-se que crianças e idosos são mais susceptíveis, devido à baixa imunidade (Pearson *et al*, 1992).

Após a cura da infecção primária, indivíduos tornam-se resistentes às infecções futuras na maioria dos casos, o que sugere a possibilidade do desenvolvimento de uma vacina contra Leishmaniose. Porém, até o momento não foi produzida uma vacina comprovadamente eficaz contra a doença, sendo a utilização de antimonials a principal forma de tratamento da LV (Ouellette e Papadopoulou, 2004).

Estas observações, juntamente com a diversidade clínica exibida pelos hospedeiros na infecção por *L. infantum*, sugerem que tanto fatores do hospedeiro quanto do parasito possam estar envolvidos na variabilidade clínica da doença. Assim, devido a sua importância e diversidade clínico-epidemiológica em nosso país, a *L. infantum* parece constituir um excelente modelo para estudos de fatores de virulência.

1.2 Proteoma em *Leishmania*

As proteínas são as moléculas responsáveis pela determinação dos fenótipos celulares em todos os organismos, de procariotos a eucariotos. Consequentemente, os fatores de virulência em *Leishmania* estão relacionados com a expressão gênica, esta por sua vez pode ser estudada por meio dos níveis de mRNA ou das proteínas propriamente ditas. No entanto, os Trypanosomatídeos regulam a expressão gênica ao nível pós-transcricional (Clayton *et al*, 2002; Rosenzweig *et al*, 2008; Paape *et al*, 2011), fazendo com que em *Leishmania*, os níveis de mRNA não necessariamente indiquem a abundância de proteínas por eles codificadas (Anderson *et al*, 1997; Gygi *et al*, 1999), além de não informarem sobre as modificações pós-traducionais adicionadas a cadeia proteica, que podem mudar drasticamente a funcionalidade desempenhada pela proteína.

A Eletroforese Bidimensional (2DE) é reconhecida como um dos métodos de separação de proteínas mais eficaz, uma vez que pode ser utilizado para analisar diferenças de expressão e as modificações pós-traducionais, com auxílio da Espectrometria de Massas (Brobey *et al*, 2007). Desde o seu surgimento, a técnica de 2DE sofreu diversos avanços que possibilitaram a análise proteômica quantitativa, assim como melhorias na resolução e reprodutibilidade dos géis. A utilização de corantes fluorescentes nesse tipo de método tem crescido bastante após o desenvolvimento da técnica de eletroforese diferencial em gel bidimensional (Differential Gel Electrophoresis - DIGE) (Heywood *et al.*, 2011). Essa técnica desenvolvida por Unlu e colaboradores (1997), possibilita o processamento e a comparação de duas amostras em um único gel através da marcação das proteínas com três diferentes fluoróforos (Cy2, Cy3 e Cy5), aumentando a sensibilidade e reprodutibilidade dos experimentos. A abundância relativa de uma proteína entre duas ou mais amostras pode ser medida através da comparação da quantidade de fluorescência emitida por cada corante para cada spot (Marouga *et al.*, 2005). No DIGE, cada spot idêntico em uma amostra é sobreposto com o seu homólogo diferencialmente marcado na outra amostra, permitindo assim uma sobreposição mais reprodutível e de fácil detecção. Além disso, o DIGE é uma técnica bastante sensível, sendo capaz de detectar até 0,5 fmol de proteína (Viswanathan *et al*, 2006).

As primeiras tentativas de estudos proteômicos realizados em *Leishmania*, foram publicados em 1980 e 1984 por Handman *et al*, 1980 e Saravia *et al*, 1984, porém nenhuma proteína foi identificada, devido ao genoma ainda não-sequenciado, impossibilitando a identificação das proteínas. Entretanto, a identificação de proteínas

retiradas de géis bidimensionais através da Espectrometria de Massa (Paape e Aebischer, 2011) passou a ter maior sucesso após o sequenciamento do genoma de *L. major*, *L. infantum* e *L. braziliensis* e disponibilidade virtual desses dados (Ivens *et al*, 2005; Peacock *et al*, 2007)

O primeiro estudo no qual se analisou proteínas que foram extraídas/retiradas de géis bidimensionais e identificadas através da Espectrometria de Massa foi realizado por El Fakhry *et al*, 2002. Estes autores compararam as formas evolutivas Promastigota e Amastigotas Axênicas de *L. infantum* e observaram 62 proteínas com diferenças de abundância. O genoma de *L. major*, *L. infantum* e *L. braziliensis* ainda não havia sido sequenciado, portanto a identificação foi realizada utilizando a sequência de aminoácidos encontrados e através de buscas de proteínas homólogas utilizando o algoritmo BLAST, que necessita de sequências conservadas para identificação das proteínas. Devido a isso, foram identificadas apenas duas proteínas (Isocitrate Dehydrogenase e Triosephosphate Isomerase).

Após o banco de dados GeneDB ser disponibilizado para o uso publico, fornecendo uma plataforma inicialmente para o genoma de *L. major* (2005) e posteriormente para os genomas sequenciados de *L. infantum* e *L. braziliensis* (2007), houve um significativo aumento no número de estudos e também de proteínas de *Leishmania* sendo identificadas através de análises proteômicas (Hertz-Fowler *et al*, 2004).

Walker e colaboradores (2006) avaliaram diferenças de expressão nas proteínas estágio-específicas entre amastigotas axênicas e promastigotas de *L. panamensis*. Eles encontraram em amastigotas axênicas 75 proteínas e, em promastigotas, 45 proteínas que foram diferencialmente abundantes (Walker *et al*, 2006).

Proteínas imunogênicas de promastigotas de *L. infantum* foram avaliadas por Dea-Ayuela e colaboradores (2006), e através de Géis Bidimensionais, Western blot e Espectrometria de Massa, foram identificadas 29 proteínas, em um total de 72 *spots* (Dea-Ayuela *et al*, 2006). No mesmo ano, Forgber e colaboradores (2006), avaliaram em um gel bidimensional com 1067 *spots*. De 330 *spots* antigênicos, 6 proteínas foram identificadas através da Espectrometria de Massa (Forgber *et al*, 2006).

Em 2011, Costa e colaboradores utilizaram a técnica de DIGE (*Differential Gel Electrophoresis*) para a comparação entre Amastigotas e Promastigotas de *Leishmania chagasi*. Foram encontrados 900 *spots* totais, e após a utilização de Western Blot para

identificação de novos antígenos para diagnósticos, foram identificadas 41 proteínas (Costa *et al*, 2011).

Carnielli e colaboradores (2014) utilizaram uma abordagem proteômica utilizando a técnica de DIGE para identificação de proteínas relacionadas à resistência a drogas. Neste trabalho, utilizaram isolados resistentes e susceptíveis de *Leishmania infantum* a miltefosina e foram selecionados 46 *spots* com diferenças de intensidade, 56.5% deles com aumento e 43.5% com diminuição da abundância entre os isolados. Dos *spots* selecionados, foram identificadas 22 proteínas, muitas delas associadas à resposta ao stress, proteção à apoptose e translocação de drogas (Carnielli *et al*, 2014).

Cuervo e colaboradores (2007) realizaram um estudo proteômico para identificar proteínas expressas em promastigotas de *L. braziliensis*, através de eletroforese bidimensional e espectrometria de massas. Em um total de 160 *spots*, foram identificadas 75 proteínas por MALDI ToF/ToF. Os genes correspondentes às proteínas identificadas estão presentes em 25 dos 35 cromossomos de *L. braziliensis*. As proteínas mais abundantes identificadas neste trabalho foram fatores de elongação, HSP-70 e outras chaperonas (Cuervo *et al*, 2007).

Alguns autores vêm desenvolvendo técnicas para aumentar o número de proteínas identificadas, o que é especialmente interessante para a construção de mapas proteômicos. Por exemplo, McNicoll e colaboradores (2006) utilizaram um pré-fracionamento com precipitações de diferentes concentrações de Sulfato de Amônio nas amostras de Promastigotas e Amastigotas de *L. infantum* de forma a aumentar a cobertura proteômica. Proteínas nas frações contendo 40 a 80% de Sulfato de Amônio foram utilizadas em géis bidimensionais, e foram detectados 2261 e 2273 em promastigotas e amastigotas, respectivamente. Foram identificadas no Espectrometro de Massa, 168 proteínas únicas.

Alguns estudos proteômicos são realizados com o objetivo de identificar proteínas de frações celulares. Para um pré-fracionamento em membranas Foucher e colaboradores (2006) utilizaram uma solubilização diferencial através de digitonina, um detergente não-iônico. Avaliaram através de géis bidimensionais extratos proteicos de promastigotas e amastigotas axênicas de *L. infantum*, em diferentes concentrações de digitonina (100 µM, 500 µM e 5 mM). A quantidade de *spots* detectados foi 983, 883, 286 e 1086 para a concentração de 100 µM, 500 µM, 5 mM e proteínas não-solubilizadas, respectivamente. Um total de 153 proteínas foram identificadas, sendo 43 proteínas hipotéticas.

Estudos Proteômicos em *Leishmania* também são utilizados para análise de abundância diferencial de proteínas com distintas abordagens e objetivos. Leifso *et al*,

2007, através da técnica de proteoma quantitativa ICAT (*Isotope Coded Affinity Tag*) identificaram proteínas diferencialmente abundantes de promastigotas e amastigotas axênicas de *L. infantum*. Identificaram com sucesso 91 proteínas, e observaram que 8% delas, eram diferencialmente abundantes na forma amastigota. Vinte por cento eram diferencialmente abundantes em promastigotas e os 72% restantes das proteínas foram considerados proteínas constitutivas. Vergnes e colaboradores (2007) avaliaram isolados resistentes e susceptíveis de *L. donovani* na Índia ao antimonial Sb(V). Foram identificadas 11 proteínas e dentre as proteínas identificadas estão a HSP83, proteína 14-3-3 e SKCRP14.1 (*small kinetoplastid calpain-related protein*), relacionada com programação de morte celular em alguns organismos, indicando a alteração da morte celular em parasitos resistentes.

Marcadores isobáricos, tais como *Tandem Mass Tag* (TMT[®], Thermo Scientific) e etiquetas isobáricas para quantificação relativa e absoluta (iTRAQ[®], Applied Biosystems) foram desenvolvidos para a marcação e quantificação de proteínas por Espectrometria de Massa em misturas complexas (Thompson *et al.* 2003; Ross *et al.*, 2004). Os marcadores isobáricos TMT[®] ligam-se ao grupo amino (ambos grupos α -amino N-terminal e ϵ -amino de resíduos de Lisina) dos peptídeos provenientes das amostras que se deseja quantificar, após a digestão trípica das misturas proteicas. Esses isóbaros possuem estruturas químicas iguais, mas diferem no número de isótopos pesados incorporados, possibilitando a marcação com até 10 isóbaros diferentes. Isso permite a quantificação simultânea de até 10 amostras.

Rosenzweig e colaboradores em 2008, realizaram um trabalho utilizando isóbaros iTRAQ[®] para quantificação relativa e absoluta durante a diferenciação de formas promastigotas em amastigotas axênicas. Um total de 1713 proteínas foram identificadas, sendo 934 com funções conhecidas ou preditas e 779 com função desconhecida. Mais da metade, (56%) das proteínas identificadas foi expressa em todos os estágios avaliados, cerca de 16% apresentavam a abundância gradativamente aumentada, 17,4% abundância gradativamente diminuídas e quase 21% não tiveram a abundância afetada.

Sardar e colaboradores (2013) observaram mudanças no proteoma de *L. donovani* em exposição ao estresse oxidativo através de marcação dos peptídeos por iTRAQ. Nove proteínas envolvidas na homeostase redox apresentaram abundância aumentada, e 3 proteínas apresentaram abundância diminuída. Proteínas envolvidas na β -oxidação, respiração mitocondrial e fosforilação oxidativa também estavam com abundância aumentada, assim como Heat Shock Protein e Trypanothione. Essa por sua

vez, desempenhando um papel central na detoxificação e consequentemente na sobrevivência do parasito.

Marcações por isóbaros também foram utilizadas para identificação de fatores de resistência a medicamentos em *L. donovani*. Singh e colaboradores (2014) realizaram um proteoma quantitativo utilizando iTRAQ em cepas resistentes/susceptíveis a DFMO. Foram observadas 82 proteínas com aumento e 19 proteínas apresentaram diminuição de abundância na cepa resistente quando comparado com a cepa susceptível (Singh *et al.* 2014).

Lynn e colaboradores (2013) através de marcação por isóbaros, realizaram um proteoma quantitativo de proteínas de membrana de *L. infantum* e *L. mexicana* e identificaram 114 e 65 proteínas com diferença de expressão, respectivamente. Em *L. infantum*, 22% dessas proteínas estavam com abundância aumentada em promastigota e 20% aumentadas em amastigota. Em *L. mexicana*, promastigota e amastigota apresentaram 17% e 11% dessas proteínas aumentadas, respectivamente (Lynn *et al.*, 2013).

Trabalhos que utilizam essas tecnologias (DIGE e iTRAQ) de marcações de peptídeos para estudos de virulência em *L. infantum*, especificamente, são ainda mais escassos. Nosso grupo de pesquisa publicou recentemente um trabalho no qual comparamos através de DIGE, promastigotas de cepas de *L. infantum* com diferença de virulência, para identificação de possíveis fatores de virulência nesta espécie. Foram identificados um total de 36 proteínas, das quais 20 estavam com abundância aumentada na cepa virulenta. Destas, 16 proteínas haviam sido descritas como fator de virulência em outras espécies de *Leishmania* spp (Pires *et al.*, 2014). Neste estudo foram identificadas um total de 414 proteínas com diferença de abundância (aumentadas e diminuídas) entre as cepas BH46 e BH400. Na forma Promastigota, foram identificadas 115 proteínas apresentando abundância diminuída, enquanto 114 proteínas apresentaram abundância aumentada, tendo-se a cepa com maior virulência como referência (BH400). Em Amastigota Axênica, 178 proteínas apresentaram abundância diminuída e apenas 66 estavam aumentadas em BH400. Por fim, 79 e 117 proteínas apresentaram abundância diminuída e aumentada, respectivamente, em BH400.

O estudo de proteínas secretadas tem sido denominado “secretoma”, e esse tipo de estudo tem sido realizado em *Leishmania*. Secretoma de promastigotas de *L. donovani* foi analisado utilizando marcação de aminoácidos por isótopos estáveis em cultura (*Stable isotope labeling by amino acids* - SILAC) por Silverman e colaboradores (2008).

A cultura de promastigota na fase estacionária foi marcada e o sobrenadante dessa cultura foi comparado com outra cultura sem a marcação como esses isótopos. Na comparação do sobrenadante dessas duas culturas, 358 proteínas foram encontradas, porém através da marcação realizada, 151 foram confirmadas como sendo secretadas pelo parasito. De acordo com o autor, a maior parte dos genes dessas proteínas não apresentou o código de sinalização para serem secretadas, propondo então a secreção via vesículas (exossomos). Cuervo e colaboradores (2009) identificaram proteínas secretadas de promastigotas de *L. braziliensis*. O sobrenadante das culturas foi retirado, precipitado e as proteínas submetidas à eletroforese bidimensional. Provenientes de 35 genes, 42 proteínas foram identificadas e submetidas a análises de bioinformática para determinar a ausência ou presença de peptídeo sinal ou vias de secreção. Duas proteínas foram preditas como sendo secretadas pela via clássica e 22 proteínas através da via não-clássica. Os autores concluíram que há uma via de secreção não-convencional (não-clássica) em *Leishmania*.

Atualmente uma importante utilização da análise proteômica tem sido a possibilidade de determinar modificações pós-traducionais, uma vez que estas são determinantes na funcionalidade proteica. Morales *et al*, 2008, realizaram o primeiro fosfoproteoma de *L. donovani* nas formas promastigotas e amastigotas axênicas. As fosfoproteínas foram imobilizadas em uma cromatografia de afinidade (IMAC) e separadas por eletroforese bidimensional. Um total de 73 fosfoproteínas foram identificadas, dentre elas, 55 com função já descrita e 18 proteínas hipotéticas. Houve mais proteínas fosforiladas na forma amastigota axênica (4%) do que em promastigotas (2.6%). Os sítios de fosforilação em *Leishmania* são sempre menos conservados quando comparados a outros Trypanosomatídeos. Em relação a esses sítios de fosforilação, *L. infantum* é mais semelhante ao *Trypanosoma cruzi* do que *T. brucei* e *T. vivax*, podendo ser reflexo da relevância desses sítios para a sobrevivência/adaptação intracelular.

Todos esses estudos proteômicos são na grande maioria exploratórios e identificam proteínas que podem direcionar as próximas pesquisas. Portanto, não são conclusivos, porém são fundamentais no avanço do conhecimento da biologia de *Leishmania* spp.

1.3 Virulência em *Leishmania*

O termo “virulência” foi definido por Chang e colaboradores (2003) como sendo o grau de patogenicidade de um microorganismo geneticamente dotado dessa capacidade, quando se manifesta contra um hospedeiro com um sistema imune intacto sob condições normais. Embora virulência seja uma característica do patógeno, ela pode ser determinada por múltiplas interações entre o parasito e o hospedeiro. Nas duas últimas décadas, um grande número de potenciais fatores de virulência em *Leishmania* tem sido descritos. Algumas das funções atribuídas a esses fatores de virulência são ligação, migração e liberação do parasito no intestino médio dos flebotomíneos, e nos hospedeiros vertebrados, o parasito modula a atividade imunológica, levando ao estabelecimento da sobrevivência intracelular, permitindo sua multiplicação e consequente evolução da infecção e patogênese da doença.

Fatores de virulência são divididos basicamente em dois grupos: O primeiro grupo consiste em determinantes invasivos/evasivos, que estão presentes na superfície do parasito e moléculas secretadas. A atividade dessas moléculas visa ajudar no estabelecimento da infecção e superar barreiras imunológicas e não-imunológicas do hospedeiro. Essas moléculas, não são a causa da doença, mas são indispensáveis para a infecção, que por sua vez é necessária para o desenvolvimento da doença. O segundo grupo consiste em moléculas patogênicas produzidas pelo parasito visando a replicação e manutenção da infecção nas células hospedeiras. A interação dessas moléculas com o sistema imune do hospedeiro pode causar imunopatologias, manifestando-se como sinais clínicos, implicando em um fenótipo virulento (Chang *et al*, 2002; Chang *et al*, 2003).

Algumas moléculas do parasito são consideradas fatores de virulência, contribuindo para a patogenicidade da *Leishmania* e permitindo a invasão celular e estabelecimento da infecção no hospedeiro (Matlashewski *et al*, 2001). Alguns desses fatores de virulência em *Leishmania* spp. incluem Glicoinositolfosfolípidos (GILPs), Lipofosfoglicanos (LPG), Proteofosfoglicanos (PPG), β -mannan, Major Surface Protease (GP63), Cisteína Proteinase, proteína de membrana de kinetoplastidos de 11 kDa (KMP-11), dentre outras proteínas já descritas na literatura. Vários dos fatores associados à virulência são proteínas, o que torna o estudo dessas moléculas de grande importância para o entendimento da biologia do parasito e sua interação com o hospedeiro vertebrado. Diferentes níveis de abundância de algumas proteínas determinam o grau de infectividade e patogenicidade do parasito (Yao *et al*, 2007).

Na literatura, observa-se o registro de diversas moléculas nas diferentes espécies de *Leishmania* causadoras de LV associadas à interação, sobrevivência e virulência na célula hospedeira. Uma delas é a proteína *Major Surface Protease* (MSP) também chamada gp63, expressa na superfície do parasito, uma metaloproteinase contendo zinco, que é encontrada em níveis aumentados em parasitos virulentos de *L. (L.) infantum* (Brittingham *et al*, 2001). A gp63 também possui função de evadir as promastigotas do sistema do complemento, além de degradar algumas enzimas citolíticas do hospedeiro, permitindo a sobrevivência das amastigotas (Hsiao, 2008).

Outra molécula expressa abundantemente na superfície de promastigotas, e uma das mais estudadas é o Lipofosfoglicano (LPG) e está envolvida em várias etapas no estabelecimento da infecção, como resistência à lise pelo complemento, ligação e entrada no macrófago, resistência às ações de antioxidantes e enzimas do hospedeiro (Späth, 2003). Quando há a diferenciação em amastigotas, os níveis de LPG são reduzidos e sua estrutura bioquímica sofre alterações (Matlashewski, 2001).

Uma proteína que têm se mostrado essencial na visceralização de *L. donovani* é a proteína A2, predominante nas formas amastigotas do parasito. Essa proteína está intimamente ligada com o nível de HSP100 nas amastigotas, sugerindo que ambas as proteínas estão envolvidas com a sobrevivência do parasito em altas temperaturas no interior do corpo do hospedeiro, ao contrário da temperatura encontrada na pele (Matlashewski, 2001; Chang *et al*, 2002).

Outras proteínas, como Triparedoxina peroxidase, S-adenosil Homocisteína Hidrolase e Tripanotiona Redutase foram também descritas como fatores de virulência e possíveis alvos para drogas (Mottram *et al*, 1998; Heikkila *et al*, 2006; Walker *et al*, 2006). Outras moléculas associadas à virulência do parasito já descritas, são a HSP70, HSP100, EF-1 β , KMP11, dentre outras (Achour, 2002; Chang *et al*; 2008).

Diante do exposto, podemos perceber que muitos dos fatores envolvidos na virulência do parasito são moléculas proteicas, o que faz das proteínas potentes candidatas ao estudo dessa relação. Logo, os diferentes níveis de abundância de algumas proteínas responsáveis pela sobrevivência de *Leishmania* spp. podem determinar o grau de virulência e patogenicidade do parasito (Yao *et al*, 2007). Assim, na busca por proteínas envolvidas com a virulência, o uso de técnicas proteômicas é especialmente importante, uma vez que os Trypanosomatídeos apresentam uma regulação pós-transcricional da expressão gênica. Além disso, essa técnica nos permite identificar pequenas diferenças na abundância de proteínas e o conhecimento das modificações pós-traducionais, as quais

têm papel relevante na modulação das funções proteicas e na regulação da resposta imune na Leishmaniose.

Nosso grupo de pesquisa publicou recentemente um trabalho no qual comparamos através de DIGE, promastigotas de cepas de *L. infantum* com diferença de virulência. Foram identificados um total de 63 *spots*, correspondendo a 36 proteínas, das quais 20 eram mais abundantes na cepa virulenta. Destas, 16 proteínas já haviam sido descritas como fator de virulência em outras espécies de *Leishmania*. Além disso, foi realizado uma predição de interação entre várias destas proteínas, e foi observado que muitas delas interagem entre si (Pires *et al*, 2014).

Entretanto, há uma falta de estudos utilizando a forma amastigota do parasito devido à dificuldade na obtenção e na quantidade de parasitos recuperados, para análises de virulência. Muitos trabalhos utilizam uma forma de amastigota axênica para realizar estes estudos. Estas formas são obtidas através da transformação de promastigotas, diminuindo o pH do meio e aumentando a temperatura de cultivo, simulando o ambiente natural das formas amastigotas. Porém, essas formas axênicas não sofrem pressão seletiva, uma vez que não entram em contato com moléculas do sistema imune e nem com outras moléculas do hospedeiro, o que pode influenciar no perfil de expressão proteica dessa forma evolutiva.

Portanto, no presente estudo foi realizada uma análise proteômica através da associação das técnicas de marcação isobárica de peptídeos (TMT) e DIGE, seguidas de identificação por Espectrometria de Massas, para avaliar as proteínas diferencialmente abundantes entre promastigotas, amastigota axênica e amastigota esplênica das duas cepas (BH46 e BH400), com o intuito de identificar fatores de virulência, e proteínas estágio-específicas de cada forma.

2. JUSTIFICATIVA

Em todas as formas das Leishmanioses, o amplo espectro clínico sugere a existência de fatores do hospedeiro e do parasito para a determinação da forma clínica, e sabe-se que fatores do parasito são determinantes na virulência. Poucos estudos utilizando uma abordagem proteômica foram realizados para identificação de fatores de virulência em *L. (L.) infantum*, mesmo sendo uma das abordagens mais interessantes e promissoras para isso.

Nossos estudos foram iniciados a partir da informação de que o grupo de pesquisa liderado pela Profa. Dra. Maria Norma Melo, do departamento de Parasitologia ICB/UFMG trabalhava com dois isolados de *L. infantum* infectantes para hamsters e cães, porém, um deles (BH400) era capaz de causar morbidade e mortalidade muito mais rápidas nos animais do que o outro isolado (BH46). No entanto, uma caracterização sistemática da virulência desses isolados não havia sido realizada. Assim, durante minha dissertação de mestrado, comprovamos experimentalmente, a diferença de virulência entre as duas cepas, além de realizar um estudo proteômico comparativo das formas promastigotas de ambas as cepas. Foram selecionados e identificados 63 *spots*, correspondendo a 36 proteínas, 20 destas proteínas foram encontrados com abundância aumentada na cepa mais virulenta. A maioria destas proteínas identificadas (16) já havia sido descrita como fator de virulência em várias espécies de *Leishmania*. Através do banco de dados STRING, realizamos uma predição da interação entre as proteínas selecionadas, e observamos que muitas delas interagem entre si, indicando que a virulência deriva não apenas uma, mas da interação entre duas ou mais proteínas. A virulência parece estar relacionada com aumentos simultâneos de algumas proteínas que interagem umas com as outras, aumentando a capacidade de invasão celular, proliferação e sobrevivência no hospedeiro (Pires *et al.* 2014).

Uma vez que os resultados já alcançados parecem contribuir para o avanço no conhecimento da biologia de *L. infantum*, e que as proteínas identificadas são promissoras para o melhor entendimento da relação parasito-hospedeiro, decidimos continuar nossa busca por fatores de virulência em *L. infantum*, através da análise proteômica entre as formas amastigotas axênica e esplênica do parasito, uma vez que essa é a forma evolutiva responsável por causar a doença no hospedeiro vertebrado.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Identificar proteínas com diferenças de abundância que possam estar relacionadas com o fenótipo virulento entre duas cepas de *Leishmania (L.) infantum*, nas formas Promastigotas, Amastigotas Axênicas e Amastigotas Esplênicas.

3.2 Objetivos específicos

- Determinar o perfil proteômico das formas evolutivas Promastigotas, Amastigotas Axênicas e Amastigotas Esplênicas, das cepas BH46 e BH400;
- Identificar proteínas diferencialmente abundantes entre as cepas BH46 e BH400 nas formas Promastigota, Amastigota Axênica e Amastigotas Esplênica;
- Categorizar funcionalmente as proteínas com diferença de abundância em ambas as cepas, de cada uma das formas evolutivas;
- Avaliar as interações proteína-proteína através da construção de redes de predição de interação proteica;
- Avaliar a presença de processos biológicos enriquecidos dentre as proteínas selecionadas com diferença de abundância;
- Selecionar proteínas que possam estar relacionadas com o fenótipo virulento em *Leishmania (L.) infantum*.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Material Biológico

Este projeto está de acordo com os princípios éticos da experimentação animal, adotadas pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) / UFMG sob o protocolo 232/2010 de 1/12/2010.

As cepas MCAN/BR/2000/BH400 e MHOM/BR/1972/BH46 da espécie *Leishmania infantum* utilizadas, foram mantidas no Laboratório de Biologia de *Leishmania* da Profa. Dra. Maria Norma Melo (Departamento de Parasitologia do ICB/UFMG), criopreservadas, e também sob a forma promastigota em cultivo em meio acelular com repiques semanais e em hamsters com repiques trimestrais.

4.1.1 Promastigotas

Hamsters em fase crônica da infecção, com cada uma das cepas, foram eutanaziados e os baços foram retirados para isolamento das promastigotas. Os tubos contendo os fragmentos de baço foram mantidos em estufa biológica (BOD - FANEM) a $23\pm 1^{\circ}\text{C}$. Foram feitos repiques contendo 200 microlitros (μL) do cultivo em novos tubos contendo Meio α - MEM completo a cada 6 ou 10 dias dependendo do crescimento do parasito. Após a terceira passagem dos parasitos no meio de cultivo, eles foram transferidos para garrafas plásticas de 25 cm^2 (Sarstedt), com um inóculo de 1×10^6 promastigotas em 10 mL de meio cultura e foi feita a curva de crescimento para determinar a fase logarítmica de cada cepa. As cepas BH46 e BH400 foram cultivadas em meio α -MEM completo em garrafas plásticas de 75 cm^2 (Sarstedt) em estufa biológica (BOD – FANEM) a $23\pm 1^{\circ}\text{C}$, com três replicatas de cada amostra. Os parasitos foram quantificados em câmara de Neubauer e coletados no final da fase logarítmica ou início da fase estacionária de crescimento, até a quinta passagem no meio de cultivo. A parti daí foram lavados 3 vezes em meio de cultura sem soro por centrifugação a 200g, 5 minutos a 4°C . Em seguida, o precipitado de células foi congelado em freezer -80°C até o momento da extração proteica.

4.1.2 Amastigotas Axênicas

Parte da cultura de promastigotas de ambas as cepas foram diferenciadas nas formas amastigotas axênicas, também em triplicatas independentes. A diferenciação foi realizada através da mudança do meio de cultura α - MEM para M199 com sais de Hanks e L-glutamina, pH 6,5 contendo 40 mM HEPES, 0,023 mM Hemina, 0,1 mM Adenina, 4 mM Bicarbonato de Sódio, Penicilina/Estreptomicina, 20% SFB em estufa com 5% CO₂, e foram coletados após 6 dias, lavados 3 vezes em meio α - MEM sem soro por centrifugação a 200g por 10 minutos a 4 °C e o precipitado de células foi congelado em freezer -80 °C até o momento da extração proteica.

4.1.3 Amastigotas Esplênicas

Hamsters (*Mesocricetus auratus*) previamente infectados com as cepas BH46 e BH400 tiveram o baço retirado e macerado em PBS. Em seguida, as formas amastigotas obtidas foram utilizadas na infecção de grupos contendo 15 animais para cada cepa com um inóculo de 10⁶ amastigotas por animal. Esta estratégia garantiu a utilização das cepas nas mesmas condições de virulência.

Após 90 dias de infecção, os baços dos animais infectados com BH46 (n=15) e BH400 (n=15) foram coletados e macerados em Daucer com meio de cultura α - MEM e em seguida centrifugados por 100 g por 10 minutos, a 10° C. Posteriormente, o sobrenadante foi coletado e adicionado Saponina 0,05% filtrada e meio α - MEM / 10% SFB. As células foram coletadas por centrifugação a 2000 g por 15 minutos a 10° C. O sobrenadante foi descartado e o pellet ressuscitado em 5ml de meio α - MEM / 10% SFB. Uma vez que o aumento de temperatura leva a transformação das formas amastigotas em promastigotas, para evitar este processo, todos os procedimentos foram realizados no gelo.

Em seguida, a suspensão de células foi passada 3 vezes em seringa com agulha 26 G e gotejado lentamente em tubo Falcon contendo 5ml de Percoll, gerando um gradiente que permite a separação das amastigotas e células esplênicas. Para isso, o material foi centrifugado a 2000 g por 45 minutos a 10° C, gerando 3 camadas distintas no tubo. Destas, a camada intermediária, referente às formas amastigotas esplênicas, foi coletada, lavada 3 vezes em meio de cultura α - MEM sem soro para remoção de qualquer

contaminante e o número de amastigotas foi determinado através de contagem em câmara de Neubauer (Chang *et al*, 1980). As células foram armazenadas em freezer -80° C até a extração proteica.

4.2 Análise proteômica

4.2.1 Obtenção das proteínas

As formas promastigotas, amastigotas axênicas e amastigotas esplênicas previamente coletadas e congeladas, foram lisadas e as proteínas solubilizadas por 2h a temperatura ambiente em Tampão de Lise (Uréia 8M, Tiouréia 2M, CHAPS 4%, DTT 65mM, Tris 1M, coquetel de Inibidores de Proteases - contendo inibidores de serino proteases e cisteíno proteases 40mM (*Protease Inhibitor Mix* – GE Healthcare) em uma proporção de 500 µL para cada 10⁹ parasitos. Posteriormente, o lisado celular foi passado 10 vezes por uma agulha 26G e em seguida centrifugado a 14000 rotações por minuto (RPM) durante 20 minutos. O sobrenadante foi aliquoteado e armazenado em freezer -80°C até o uso. A concentração proteica foi determinada utilizando o kit *2D QuantKit* (GE Healthcare) segundo recomendações do fabricante.

4.2.2 Eletroforese Bidimensional (2-DE)

A focalização isoeletrica (IEF) de misturas proteicas permite a separação dessas moléculas de acordo com seu ponto isoeletrico. Para isso, foram utilizadas *strips* de gradiente de pH imobilizado (IPG) de 4 até 7, (GE-Healthcare) com 18 cm de comprimento, para obtermos uma maior separação e resolução, facilitando a futura excisão dos *spots* para a Espectrometria de Massa. As *strips* de 18cm foram hidratadas com 600 µg de proteína, Tampão IEF (8M Uréia, 2M Tiouréia, 4% CHAPS, 0,0025% Azul de Bromofenol) e 1% anfólitos IPG *buffer* pH 4-7, em um volume total de 340 µl por *strip*. A hidratação das *strips* ocorreu em temperatura ambiente por 12 horas. Em seguida, as *strips* contendo as amostras foram submetidas à Focalização Isoeletrica (IEF) no equipamento *Ettan™ IPGPhor™ 3* (GE-Healthcare), a 50µA/strip com as seguintes condições: 500V por 12 horas; 1000V por 1 hora e 30 minutos; 8000V por 2 horas; 8000V até acumular 40000Vh e 500V por 1 hora.

Após a IEF, as *strips* foram equilibradas para redução e alquilação das proteínas com Tampão de Equilíbrio (50 mM de Tris 1,5M pH 8,8, 6M Uréia, 30% Glicerol, 2% Dodecil Sulfato de Sódio - SDS, 0,001% v/v Azul de Bromofenol 0,5%) contendo 10mg/mL de Ditioneitol (DTT) por 15 minutos sob leve agitação. Essa solução foi substituída por Tampão de Equilíbrio contendo 25mg/mL de Iodoacetamida (IAA) em vez de DTT. Posteriormente, as *strips* foram lavadas rapidamente em Tampão Tris-Glicina 10% e posicionadas horizontalmente na parte superior do gel de poliacrilamida SDS-PAGE 12% e cobertas com Agarose 0,5% contendo azul de bromofenol 0,002%.

Para a segunda dimensão, foi utilizado o aparelho de eletroforese vertical *Etta* *DALTsix Electrophoresis Unit* (GE – Healthcare). A corrida dos géis foi limitada a 50V/gel e 25mA/gel nos primeiros 15 minutos, e após esse tempo, a corrente foi aumentada para 100V/gel e 50mA/gel a 10°C, até a completa separação por massa molecular das proteínas.

Ao término da eletroforese, os géis bidimensionais foram colocados em solução fixadora contendo Ácido Ortofosfórico 2% e Etanol 30% por 12 horas em temperatura ambiente; em seguida em solução contendo Ácido Ortofosfórico 2%, realizando-se 3 lavagens de 10 minutos cada e por último em solução contendo Ácido Ortofosfórico 2%; Etanol 18% e Sulfato de Amônio 12% por 30 minutos. A essa solução foi acrescentado 0,1% de *Coomassie Brilliant Blue G-250* 4% (GE – Healthcare) para a coloração das proteínas por 5 dias (Neuroff, 1985). Após esse período, o *background* foi removido com Etanol 20% e as imagens dos géis foram digitalizadas, utilizando-se o *scanner ImageScanner* (Amersham Biosciences).

Após a digitalização dos géis, a análise da reprodutibilidade dos perfis proteômicos de cada amostra foi realizado no *software ImageMaster 2D Platinum v6.0* (GE Healthcare), avaliando-se o índice de correlação (*Scatter Plot*) da sobreposição entre as imagens e a porcentagem de *match* entre os géis.

4.2.3 Differential Gel Electrophoresis (DIGE)

Após avaliarmos a qualidade e reprodutibilidade das amostras através dos géis bidimensionais, foi utilizada uma metodologia mais sensível para se avaliar a diferença de abundância de proteínas das formas evolutivas nas cepas BH46 e BH400. Para isso,

foi realizada a técnica Gel de Eletroforese Diferencial (*Differential Gel Electrophoresis-DIGE*).

O extrato proteico de 3 cultivos independentes /animais de cada forma evolutiva do parasito, de ambas as cepas foram marcados com o fluoróforo CyDye™ (GE Healthcare), conforme o delineamento experimental demonstrado na Tabela 1. A marcação das proteínas foi realizada de modo a ocorrer a inversão das amostras com diferentes fluoróforos (*Dye Swab* com Cy3 e Cy5), e para a normalização dos dados, uma mistura de todas as amostras foi marcada com o fluoróforo Cy2, sendo este o padrão interno.

Tabela 1: Delineamento experimental para marcação das amostras com os fluoróforos de modo a ocorrer a inversão dos corantes. Foram geradas 3 imagens para cada amostra, com um padrão interno (Cy2) em cada gel.

Gel Nº	Fluoróforo/amostra		
	Cy3	Cy5	Cy2
1	Amastigota Axênica BH400	Amastigota Axênica BH46	Todas as Amostras
2	Amastigota Esplênica BH 400	Amastigota Axênica BH400	Todas as Amostras
3	Amastigota Axênica BH46	Amastigota Esplênica BH46	Todas as Amostras
4	Amastigota Esplênica BH46	Amastigota Axênica BH46	Todas as Amostras
5	Promastigota BH400	Amastigota Axênica BH400	Todas as Amostras
6	Promastigota BH46	Amastigota Esplênica BH400	Todas as Amostras
7	Amastigota Esplênica BH400	Amastigota Esplênica BH46	Todas as Amostras
8	Promastigota BH46	Promastigota BH400	Todas as Amostras
9	Promastigota BH400	Promastigota BH46	Todas as Amostras

As amostras foram mantidas a -80°C até o momento do uso. O pH das amostras foi medido e quando preciso, ajustado para 8,5 com HCl 0,5 nM ou NaOH 500 mM. Foi utilizado para a marcação 400 pmol de cada fluoróforo (Cy2, Cy3 e Cy5) em 50 µg de proteína. As amostras após a marcação, foram homogeneizadas, centrifugadas rapidamente e deixadas no gelo por 30 minutos. Após esse tempo, foi acrescentado 1 µl

de L - Lisina 10 mM para interromper a marcação dos fluoróforos com as proteínas e foram deixadas no gelo por 10 minutos. Posteriormente, as amostras marcadas com o fluoróforo foram utilizadas para hidratar *strips* de 18 cm, pH 4-7 por 12 horas. Em uma mesma *strip* foram colocadas amostras de cada cepa, além de uma mistura das duas cepas marcadas com o padrão interno (Cy2). A Primeira e Segunda Dimensão do gel bidimensional foi realizada conforme descrito anteriormente.

Após o término da segunda dimensão, os géis foram digitalizados no *scanner Typhoon FLA 9000* (GE-Healthcare), utilizando os seguintes parâmetros para excitação e emissão da fluorescência: Cy2 (488/520 nm), Cy3 (532/580 nm) e Cy5 (633/670 nm).

4.2.3.1 Análise dos géis

As imagens dos géis DIGE foram importadas para análise no *software*: DeCyder™ 2-D Differential Analysis Software v7.2 (GE - Healthcare). Esse programa tem como principal função a análise de géis fluorescentes realizados através da técnica DIGE, permitindo uma análise automatizada das imagens quanto à detecção, quantificação, sobreposição das imagens e análise estatística dos resultados.

Esse *software* é dividido em 5 módulos, sendo eles o *Image Loader*, *Organizer*, *Differential in-gel Analysis* (DIA), *Biological Variation Analysis* (BVA), e o *Extended Data Analysis* (EDA), conforme exemplificado na Figura 1.

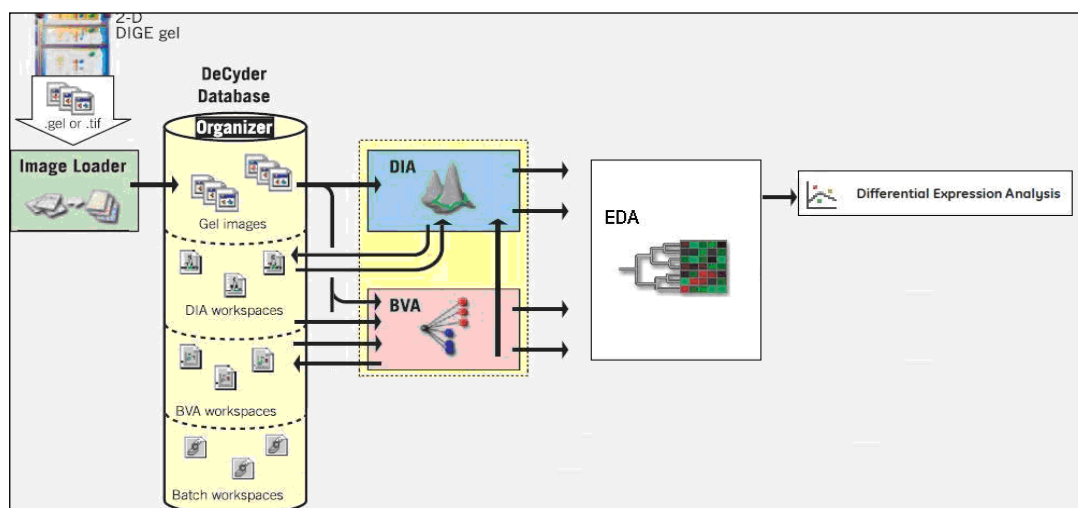


Figura 1: Esquema da análise das imagens obtidas dos géis fluorescentes utilizando o software DeCyder™ 2-D Differential Analysis Software v7.2 (GE Healthcare).

Após obtermos as imagens dos géis fluorescentes, estas foram enviadas para o primeiro módulo do software: o *Image Loader*. Nesse módulo foi ajustado o contraste e o brilho das imagens para facilitar a análise. No segundo módulo do programa (*Organizer*) permitiu-se agrupar as 3 imagens dos diferentes fluoróforos em cada gel.

No módulo DIA, os *spots* marcados com os diferentes fluoróforos foram detectados e quantificados. A detecção desses *spots* foi delimitada de acordo com os parâmetros escolhidos, sendo eles: inclinação (*Slope*), volume, área e o tamanho do pico, conforme exemplificado na Figura 2.

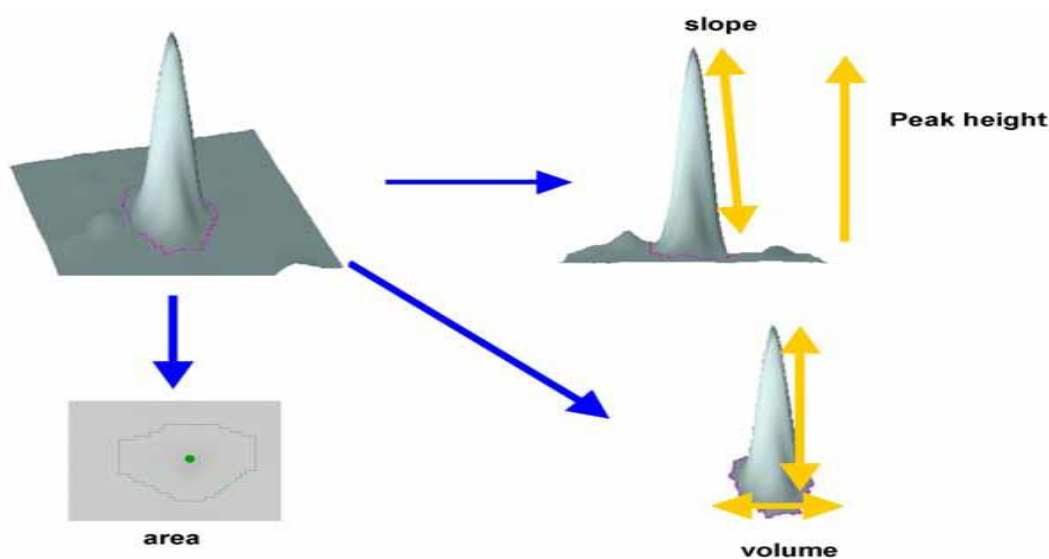


Figura 2: Definição dos parâmetros utilizados na seleção dos *spots*. **Área:** área expressa em pixels dentro de um *spot* delimitado. **Inclinação (*Slope*):** Medida dos atributos tridimensionais do *spot*.

Foi observado que artefatos que não eram *spots* possuíam um valor de Inclinação elevado, e Área pequena. Portanto, os parâmetros utilizados para se chegar a uma detecção satisfatória, eliminando diversos artefatos foram: Inclinação $\geq 0,87$; Área ≤ 350 .

Após a detecção dos *spots* através dos parâmetros utilizados, foi necessário realizar uma edição manual para a deleção de artefatos que possam ter sido erroneamente detectados através dos parâmetros utilizados. Portanto, após essa etapa minuciosa de edição, foi avaliada a qualidade da reprodutibilidade dentre as 3 imagens de cada amostra.

As imagens foram exportadas para o terceiro módulo do *software* denominado *Biological Variation Analysis* (BVA). O BVA possui 4 diferentes modos de visualização

e trabalho. O primeiro modo, denominado *Spot Map Mode* é o lugar onde se organiza o *design* experimental, o qual será necessário mais tarde para a análise estatística. O segundo modo, *Match Mode* é uma análise comparativa de sobreposição entre as imagens dos géis. Portanto, as três imagens de uma mesma amostra marcada com Cy3 e Cy5 são agrupadas e comparadas através de sobreposição com as outras 3 imagens da outra amostra que também estão agrupadas.

O modo *Protein Mode*, é utilizado para demonstração de vários dados de cada *spot*, tais como: Razão Média, Ponto Isoelétrico, Massa Molecular, além de dados estatísticos como o *Test T Student*, One-Way ANOVA e Two-Way ANOVA. Através desses dados, pode-se filtrar e selecionar apenas *spots* estatisticamente significativos.

O último modo é denominado *Appearance Mode* e é utilizado para obter dados estatísticos de apenas *spots* individuais, não o correlacionando com os outros *spots* do gel.

Para seleção das proteínas diferencialmente abundantes, foi realizada a sobreposição das imagens (*match*) entre Promastigotas da cepa BH46 e Promastigotas da cepa BH400 no modo *Match Mode*. Após a sobreposição, foi realizada uma avaliação da qualidade do *match* em uma escala de 0 a 15, onde quanto menor o valor, mais confiável a sobreposição.

Após uma revisão e edição minuciosa para averiguar e corrigir a qualidade do *match*, no *Protein Mode* os *spots* foram submetidos ao teste One-Way ANOVA. Todos aqueles com o valor de $P \leq 0,05$ e $Ratio \geq 2$ foram selecionados como sendo diferencialmente abundantes.

Esses *spots* foram exportados para o módulo *Extended Data Analysis* (EDA), que é utilizado para análises multivariáveis de abundância de proteínas provenientes do módulo BVA, sendo capaz de analisar estatisticamente, dados de até 1000 géis simultaneamente.

Portanto, *spots* com diferenças de intensidade ($Fold-Change \geq 2$) estatisticamente significativos ($P \leq 0,05$) foram selecionados e excisados dos géis para a identificação por espectrometria de massa MALDI-ToF/ToF.

4.2.4 Espectrometria de Massa: MALDI-ToF/ToF

Para a identificação dos *spots* selecionados na análise do DIGE, os mesmos foram excisados dos géis e descorados através de três lavagens de 15 minutos cada com 400 µL de uma solução de Acetonitrila 50% e Bicarbonato de Amônio 25 mM, pH 8,0 sob constante agitação. A solução descorante foi removida, em seguida os *spots* foram desidratados com 200 µL de Acetonitrila P.A. durante 5 minutos. Após secagem, foi adicionado 10 µL de Tripsina (Promega, USA) 20 ng/µL e 20 µL de Bicarbonato de Amônio 50mM para a digestão enzimática das proteínas, no gelo. As amostras foram deixadas a 37 °C por 16-24 horas para a completa digestão e fragmentação das proteínas. As soluções contendo Tripsina e Bicarbonato de Amônio foram coletadas e transferidas para tubos novos, e ao tubo anterior, contendo os fragmentos de géis, foi adicionada uma solução de Ácido Fórmico 5% e Acetonitrila 50% e deixado por 30 minutos sobre constante agitação. Após esse tempo a solução foi removida e transferida para o tubo contendo a primeira solução retirada. O procedimento anterior com Ácido Fórmico 5% e Acetonitrila 50% sob constante agitação foi repetido e essa solução também foi transferida para o tubo contendo os outros extratos. Os tubos contendo todos os extratos foram concentrados utilizando o aparelho *Concentrator Plus*[®] (Eppendorf, USA) até o volume final de 10 µL.

Os extratos foram passados em colunas *ZipTip*[®]C18 (Millipore, USA) para dessalinização e concentração dos peptídeos. Aproximadamente 0,5 µL da amostra concentrada foi misturada com 0,25 mL de uma solução saturada de matriz [10 mg/mL α-ciano-4-hidroxicinâmico (Aldrich, Milwaukee, WI), em 50% acetonitrila/0.1% de ácido trifluoroacético]. As amostras foram aplicadas na placa *MTP AnchorChip*[™] 600/384 (Bruker Daltonics) e deixadas secando em temperatura ambiente. Os dados brutos para a identificação das proteínas foram obtidos no MALDI-TOF/TOF Autoflex III[™] (Bruker Daltonics, Billerica, EUA) com o instrumento no modo positivo/refletor controlado pelo software *FlexControl*[™]. A calibração do instrumento foi realizada através da utilização de peptídeos de calibração padrão II (Bruker Daltonics) como referência. Picos de contaminação de tripsina e queratina foram excluídos da lista utilizada na pesquisa em banco de dados. Cada espectro foi produzido pela acumulação de dados a partir de 200 disparos consecutivos do laser.

Os dados obtidos foram armazenados e levados para o *software Bruker Daltonics BioTools 3.2*[™], onde foi realizada a pesquisa no banco de dados MASCOT (Matrix

Science, USA – <http://www.matrixscience.com>). Apenas proteínas com valores de *score* $P \leq 0,05$ foram levados em consideração na identificação.

4.2.5 Marcação Isobárica - *Tandem Mass Tag* (TMT)

A digestão trípica dos extratos proteicos de 3 cultivos/animais independentes de cada forma evolutiva do parasito e de ambas as cepas, foi realizada utilizando o kit *FASP™ Protein Digestion Kit* (Expedeon), seguindo as recomendações do fabricante.

Após a digestão das proteínas em peptídeos, as amostras foram marcadas com isóbaros específicos, provenientes do kit *TMT® Sixplex Isobaric Mass Tagging* (Thermo Scientific). Foi utilizado para a marcação 0,8 mg de cada isóbaro (TMT⁶-126; TMT⁶-127; TMT⁶-128; TMT⁶-129; TMT⁶-130 e TMT⁶-131) em 100 µg de cada amostra. Essa reação foi incubada por uma hora em temperatura ambiente, para a completa marcação. Após esse tempo de incubação, foi acrescentado 8µl de Hidroxilamina 5% para interromper a marcação dos isóbaros com os peptídeos e incubado por 15 minutos. Após esse tempo, as amostras foram combinadas e armazenadas a -80°C.

4.2.6 Espectrometria de Massa: Orbitrap Q-Exactive (LC-MS/MS)

Os peptídeos marcados com isóbaros provenientes do kit TMT foram concentrados em speedVAC e reconstituídos em 25 µL de Acetonitrila 5% / Ácido Fórmico 0,2% (v/v) e separadas em nanoACQUITY (Waters) UPLC. Acoplado à cromatografia líquida, as amostras foram injetadas no Espectrômetro de Massas *Thermo Scientific™ Q Exactive™ Hybrid Quadrupole-Orbitrap* e ionizadas por Eletrospray. Os espectros de massa foram adquiridos em m/z 300-1750 com uma resolução de 70.000 (m/z 200) e foram selecionados os 12 íons precursores mais abundantes para MS em tandem para fragmentação via HCD usando taxa de isolamento de 1,2 Da; energia de colisão de 30; e uma resolução de 35,000.

4.3 Organização e Análise dos Dados Proteômicos

Os espectros dos peptídeos identificados foram extraídos dos dados brutos provenientes do Espectrômetro de Massa através do software *Thermo Proteome*

Discoverer 2.1. Esses espectros foram submetidos contra o banco de dados de proteínas NCBI. Foi utilizado o algoritmo MASCOT para a realização da busca e comparação dos espectros preditos/experimentais e, por fim, identificação desses peptídeos/proteínas. Além disso, esse software permitiu-nos observar a quantificação das proteínas marcadas pelos isóbaros do kit TMT.

Os dados da quantificação pelo TMT e pelo DIGE foram combinados e todas as proteínas com Fold Change ≥ 2 e $P \leq 0,05$ foram mantidas para nossas análises comparativas. Primeiramente, as sequências de aminoácidos de cada proteína com diferença de abundância foram obtidas no formato FASTA, provenientes do banco de dados NCBI.

Em colaboração com o Laboratório de Informática e Biosistemas do Centro de Pesquisas Renè Rachou/Fundação Osvaldo Cruz, supervisionado pelo pesquisador Dr. Jeronimo Conceição Ruiz, para correção de qualquer redundância das anotações foi utilizado o programa BLASTp para localizar regiões de similaridade entre as sequências experimentais e depositadas no banco de dados. A significância estatística das comparações foi calculada, sendo considerado significativo os resultados de Área de Cobertura e Identidade superiores a 95%.

Foram confeccionados diagramas de Venn comparando essas proteínas com diferença de abundância entre as cepas, utilizando o Identificador das proteínas do banco de dados NCBI. Dessa forma, os dados foram organizados e foi possível observar quais proteínas foram encontradas com aumento e diminuição da abundância na cepa BH400.

Além disso, as proteínas foram categorizadas funcionalmente através das anotações dos processos biológicos catalogados de acordo com o consórcio “Gene Ontology”, projeto que desenvolveu ontologias formais que representam mais de 40.000 conceitos biológicos e estão constantemente sendo revisados para refletir novas descobertas. Estes conceitos têm sido utilizados para “anotar” funções de genes com base em experiências relatadas em mais de 100.000 artigos científicos. A análise desse conjunto de dados genômicos foi realizada a partir da plataforma de bioinformática *Blast2GO Pro* (BioBam Bioinformatics), onde as proteínas foram agrupadas funcionalmente.

Com o intuito de avaliar potenciais relações na modulação de processos biológicos dessas proteínas, foram preditas redes de interações proteína-proteína associada com o proteoma total do organismo depositada em banco de dados. Para essa predição, foi utilizado o banco de dados STRING, v10.5 (Protein-Protein Interaction Networks -

<http://string-db.org>), utilizando um valor de corte de interação de 0,4, considerado de confiança média. Esse banco de dados fornece uma rede de interações preditas ou já descritas na literatura entre proteínas ou entre genes. As interações incluem associações diretas (físicas) e indiretas (funcionais), que são derivadas de quatro fontes: contexto genômico, experimental, co-expressão (conservado) e baseados em conhecimentos prévios.

A partir das redes preditas de interações e a categorização funcional realizada, foi avaliada a presença de processos biológicos mais significativos para cada rede de interação, utilizando o método de distribuição hipergeométrica com correção de valor de probabilidade pelo método de taxa de falsas descobertas (FDR - *false discovery rate*) para minimizar resultados falsos positivos. Essa análise de processos biológicos enriquecidos foi realizada através do pacote BINGO implementado no programa *Cytoscape* 3.4.0, sendo considerados significativos os processos biológicos com valor de P-corrigido menor que 0,05.

Por fim, foram confeccionados diagramas de Venn Triplos das proteínas com abundância aumentada e diminuída em BH400 nas formas Promastigota, Amastigota Axênica e Amastigota Esplênica, com objetivo de selecionar proteínas presentes em pelo menos duas formas evolutivas, a fim de filtrar proteínas encontradas diferencialmente abundantes na cepa virulenta. Para isso, foi utilizado a ferramenta online Venny 2.1, disponível em: <http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny>.

5 RESULTADOS

5.1 Material Biológico

Para identificarmos a fase logarítmica de crescimento das cepas utilizadas neste estudo (BH400 e BH46), uma curva de crescimento da forma promastigota foi obtida (Figura 3). Os parasitos utilizados para a extração proteica foram coletados no final da fase logarítmica/início da fase estacionária de crescimento (por volta do 7º dia de cultivo), até a quinta passagem no meio de cultivo.

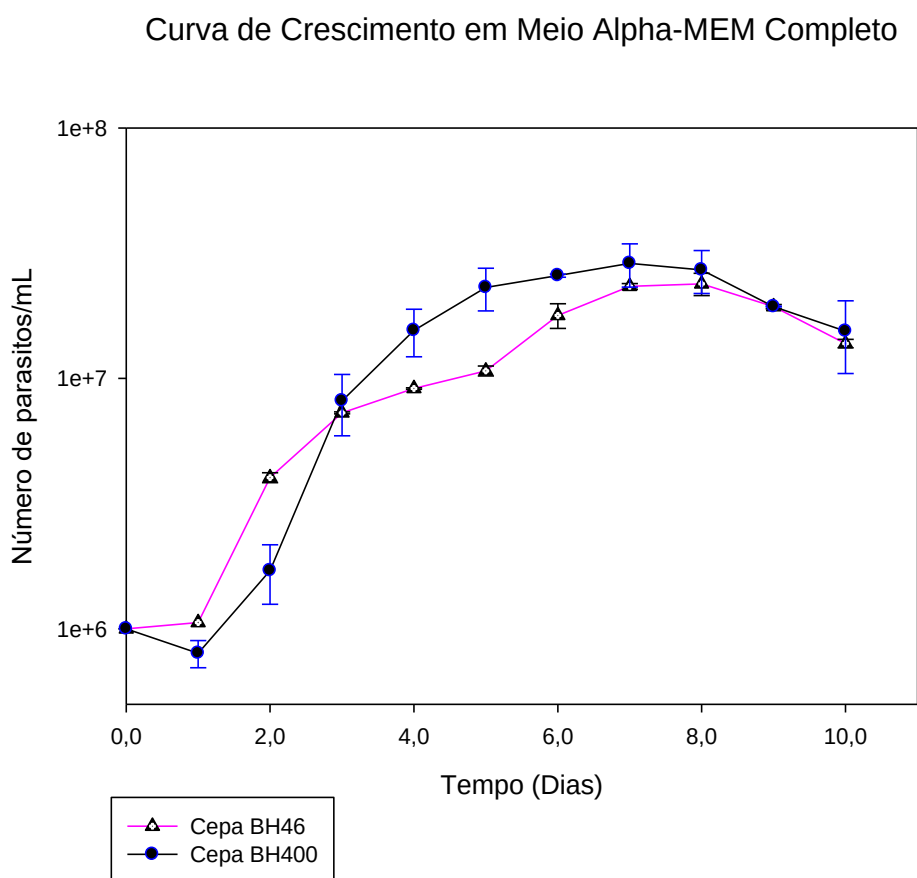


Figura 3: Curva de crescimento das cepas BH46 e BH400 de *L. infantum* na forma Promastigota em meio α - MEM completo.

Após a transformação das Promastigotas em Amastigotas Axênicas (seção 4.1.2 do Materiais e Métodos) e obtenção das Amastigotas Esplênicas (seção 4.1.3 do Materiais e

Métodos) os precipitados das várias formas de parasitos foram armazenados em freezer -80°C até o momento da extração proteica.

5.2. Análise Proteômica

5.2.1 Eletroforese Bidimensional (2-DE)

Para avaliarmos a qualidade da técnica de 2-DE bem como das amostras proteicas, foram confeccionados géis bidimensionais em strips de 18 cm, pH 4-7, SDS-PAGE 12% e coloração por Comassie blue G250 de cada forma evolutiva, em ambas as cepas de *L. infantum* (Figura 4).

Esses géis foram utilizados para Análise de Reprodutibilidade do Perfil Proteômico utilizando o programa *ImageMaster 2D Platinum* v6.0 (GE Healthcare). Foi obtido um índice de correlação entre as replicatas de promastigotas, amastigotas axênicas e esplênicas da cepa BH46 de 0,87; 0,94 e 0,99, respectivamente. O mesmo índice foi calculado para os géis obtidos com a cepa BH400, sendo de 0,96; 0,82 e 0,89 para promastigotas, amastigotas axênicas e esplênicas, respectivamente (Figura 5). Ressaltando que valores próximos a 1,0 significam 100% de correlação entre as posições relativas dos *spots* nos géis. Valores a partir de 0,80 já são considerados aceitáveis devido aos vieses da técnica (Görg *et al*, (2007).

Através dessa análise, podemos observar que os perfis proteicos das formas evolutivas utilizadas das cepas BH46 e BH400 apresentaram boa reprodutibilidade, principalmente em relação ao número de *spots*, intensidade, posição e distribuição dos *spots* no gel. Dessa forma, os índices de correlação obtidos nos indicaram que as amostras estavam adequadas para prosseguirmos com a avaliação comparativa da diferença de abundância de proteínas entre as formas evolutivas das diferentes cepas através da técnica de DIGE.

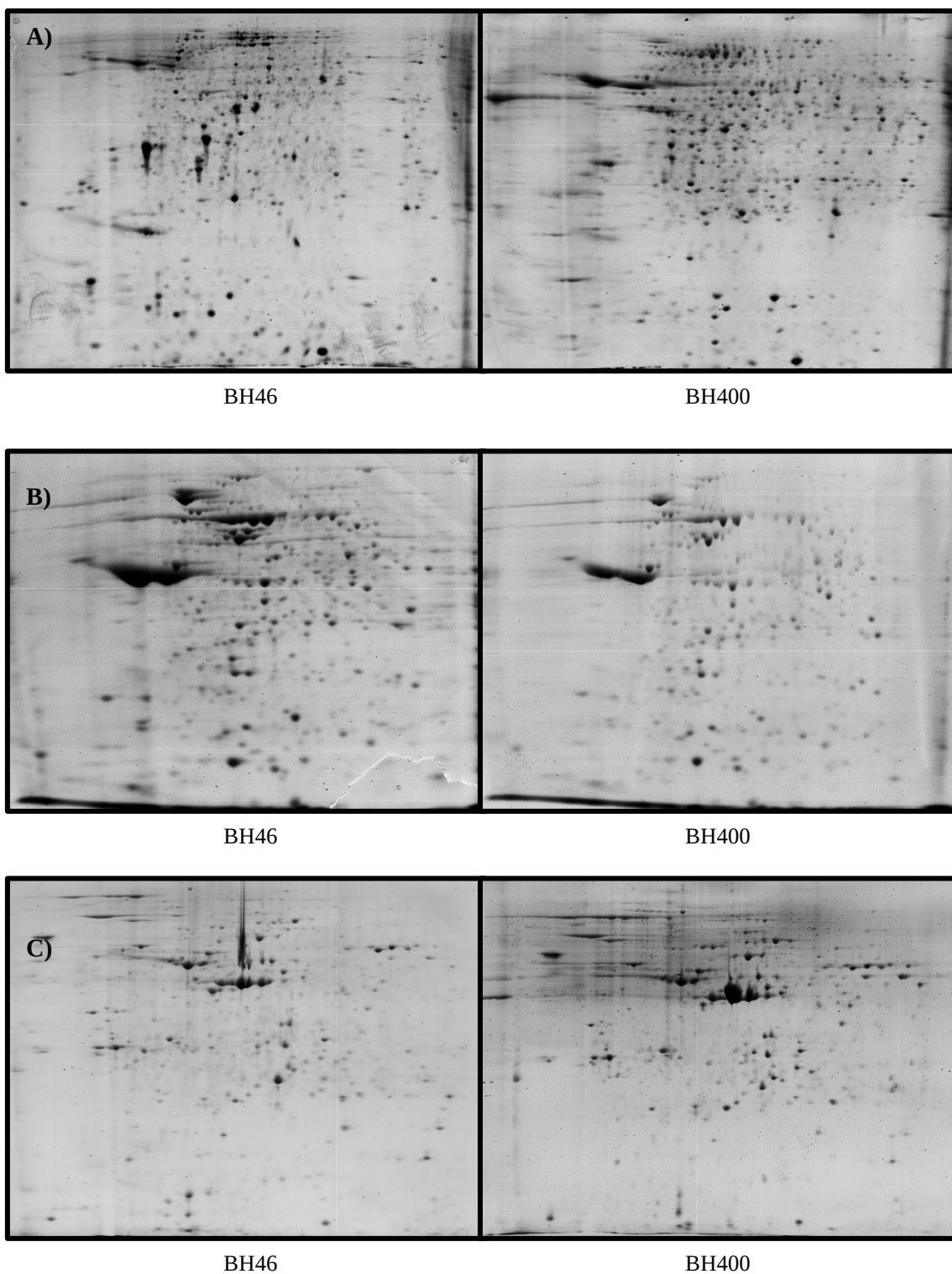


Figura 4: Representação dos géis bidimensionais com 600 μ g de proteína de *L. infantum* das cepas BH 46 (direita) e BH400 (esquerda) em *strips* de 18 cm, pH 4-7 SDS-PAGE a 12%, corados por *Coomassie Brilliant Blue G-250*. (A) Promastigota; (B) Amastigota Axênica; (C) Amastigota Esplênica.

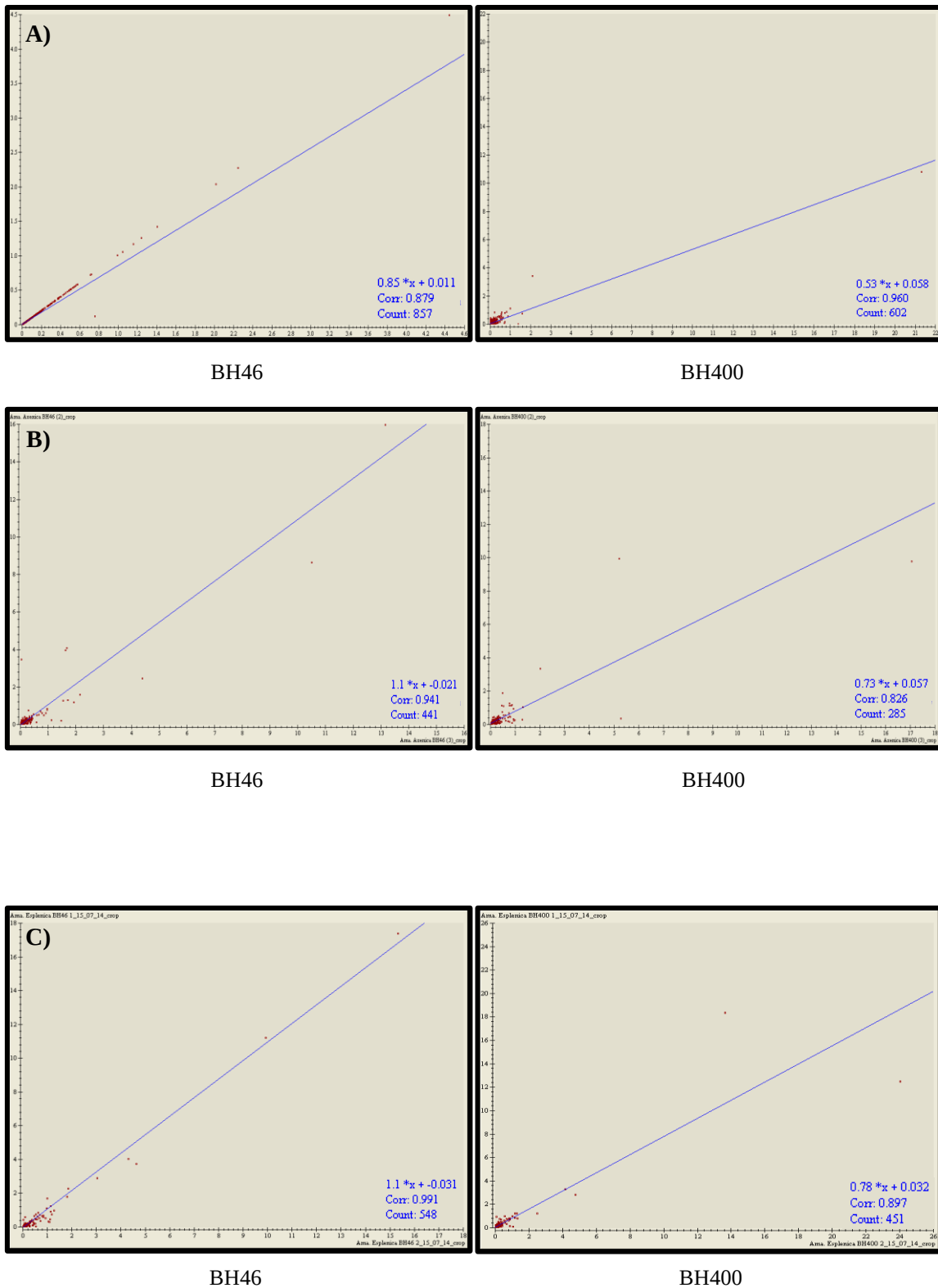


Figura 5: *Scatter Plot* representando (eixo X) a relação entre os valores de % de volume de cada *spot* com os valores (eixo Y) de % de volume do gel usado como referência para a comparação. Corr: Índice de Correlação; Count: Quantidade de *match* entre os géis. (A) Promastigota; (B) Amastigota Axênica; (C) Amastigota Esplênica.

5.2.2 Differential Gel Electrophoresis (DIGE)

A primeira etapa na avaliação comparativa da diferença de abundância das proteínas entre as cepas BH400 e BH46, foi a obtenção dos géis DIGE, a partir de amostras de promastigotas, amastigotas axênicas e esplênicas. Após a marcação 50 µg de cada uma das amostras proteicas com os fluoróforos, strips de 18 cm, pH 4-7 foram hidratadas e as proteínas, em seguida, separadas através da IEF. Posteriormente, foi realizada o fracionamento em gel de poliacrilamida 12%, seguida da digitalização dos géis no aparelho *Typhoon FLA 9000* (GE-Healthcare). Podemos observar na Figura 6 as imagens fluorescentes marcadas com os fluoróforos Cy3 e Cy5 dos géis DIGE dos extratos proteicos de *L. infantum*, e a representação em escala de cinza dessas imagens sobrepostas.

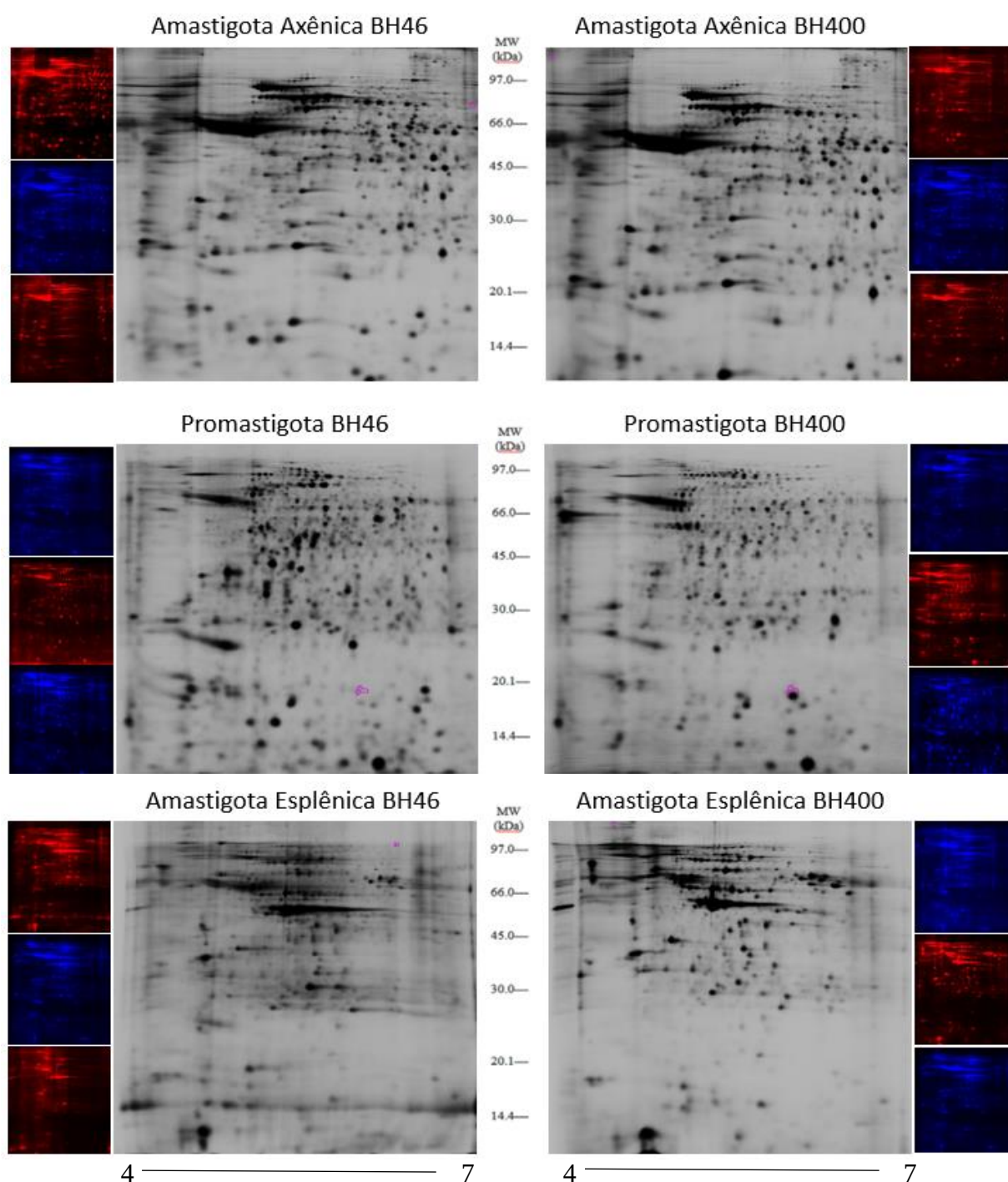


Figura 6: Imagem representativa dos Géis DIGE das cepas BH46 e BH400 de *L. infantum*, a partir de *strips* de 18 cm, pH 4 – 7 contendo 50µg de proteína de cada amostra previamente marcadas com os fluoróforos. O gel em preto e branco ao centro representa o perfil proteico de cada amostra. As imagens azuis e vermelhas representam a amostra marcada com os fluoróforos Cy3 e Cy5, respectivamente.

Os géis DIGE foram analisados utilizando o *software DeCyder™ 2-D Differential Analysis Software v7.2* (GE - Healthcare). Inicialmente, no módulo DIA os *spots* foram detectados e quantificados de acordo com os parâmetros citados anteriormente (seção 4.2.5 do Materiais e Métodos).

Após a detecção dos *spots* e uma minuciosa edição para confirmar a qualidade da detecção realizada pelo *software*, foi realizado o *match* entre as imagens, permitindo a sobreposição dos *spots* correspondentes entre as imagens de cada cepa. Após essa etapa, foi avaliada a diferença de expressão entre as amostras através do teste estatístico *One-Way ANOVA* ($P \leq 0,05$) e valor de *Ratio* ≥ 2 . A Figura 7 é uma imagem representativa de um *spot* selecionado como mais abundante na cepa BH46 em relação a cepa BH400.

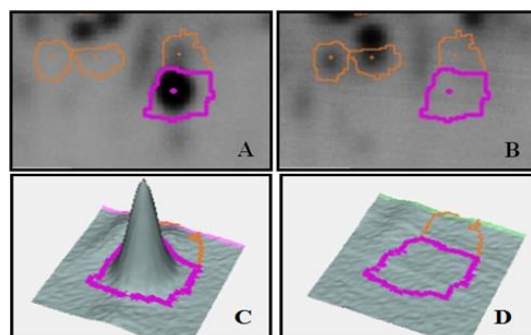


Figura 7: Imagem representativa de um dos *spots* com diferença de abundância entre na cepa BH46 (A) em relação ao mesmo *spot* na cepa BH400 (B) e a representação tridimensional do respectivo *spot* nas cepas BH46 (C) e BH400 (D)

No módulo *Extended Data Analysis* (EDA), os *spots* selecionados com diferença de intensidade ($P \leq 0,05$ e valor de *Ratio* ≥ 2) foram submetidos a análises de padrões entre ambas as cepas. Podemos observar que no perfil de intensidade dos *spots* globais, detectados nas 3 formas evolutivas das cepas estudadas, as maiores variações estão na forma amastigota esplênica enquanto a promastigota e amastigota axênica são mais similares entre si. Em Promastigota, a quantidade de *spots* com intensidade aumentada (vermelho) e diminuída (verde) são relativamente similares entre as cepas BH46 e BH400. Porém em Amastigota Axênica essa similaridade diminui e em Amastigota Esplênica o número de *spots* com intensidade aumentada na cepa de maior virulência (BH400) é ligeiramente predominante (Figura 8).

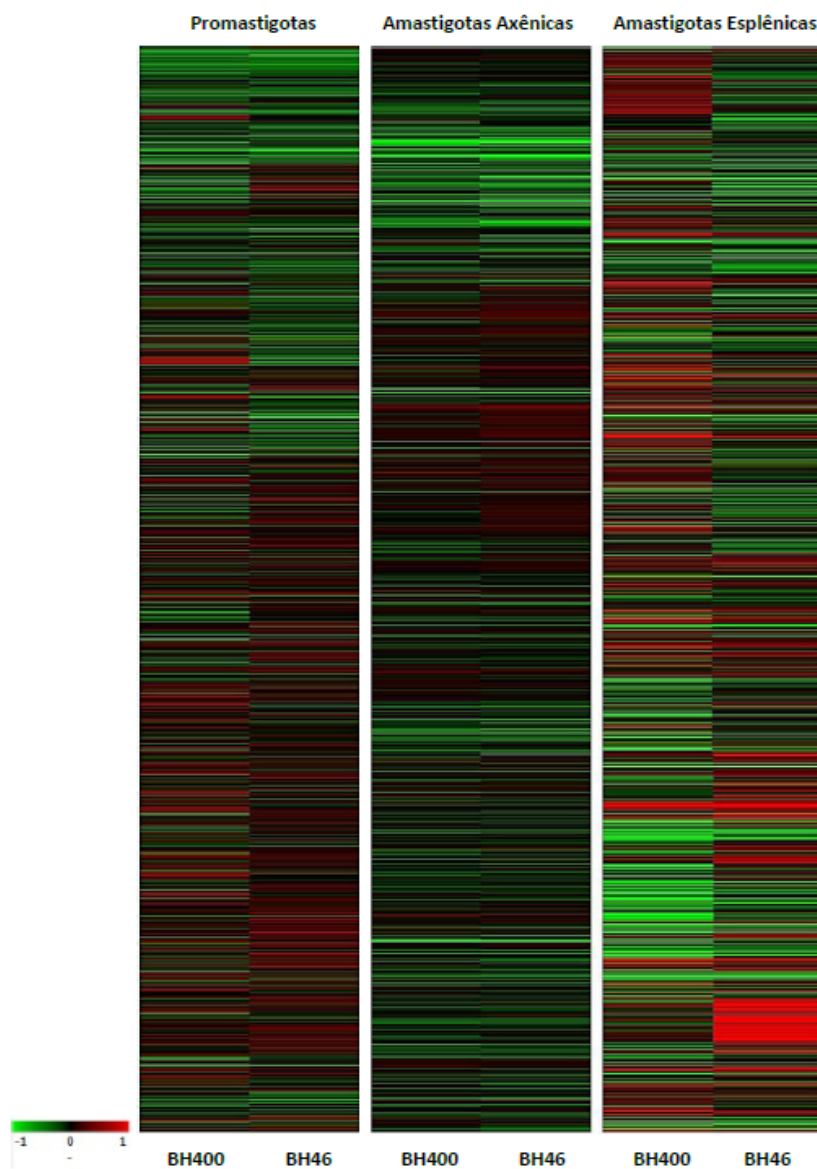


Figura 8: “Heat map” e agrupamento hierárquico dos dados do 2D-DIGE. Foi realizado o agrupamento hierárquico (*Pattern Analysis*) das 3 formas evolutivas das cepas BH46 e BH400 com base no padrão de *spots* globais marcados pelo DIGE. Os valores de expressão relativa estão exibidos na escala colorimétrica usando o log de abundância padronizado, variando de -1 (regulado-negativamente; verde) para 1 (regulado-positivamente; vermelho). As cepas são mostradas no eixo horizontal e os *spots* são mostrados no eixo vertical.

As intensidades dos spots selecionados com diferença de abundância são mostradas na Figura 9. Observa-se que em Promastigotas e Amastigotas Axênicas de ambas as cepas apresentam uma distribuição equivalente de *spots* com intensidades aumentadas (vermelho) e diminuídas (verde). Porém em Amastigota Esplênica, a quantidade de *spots* selecionados com aumento de intensidade (vermelho) na cepa BH400 é muito superior quando comparado com as intensidades da cepa BH46.

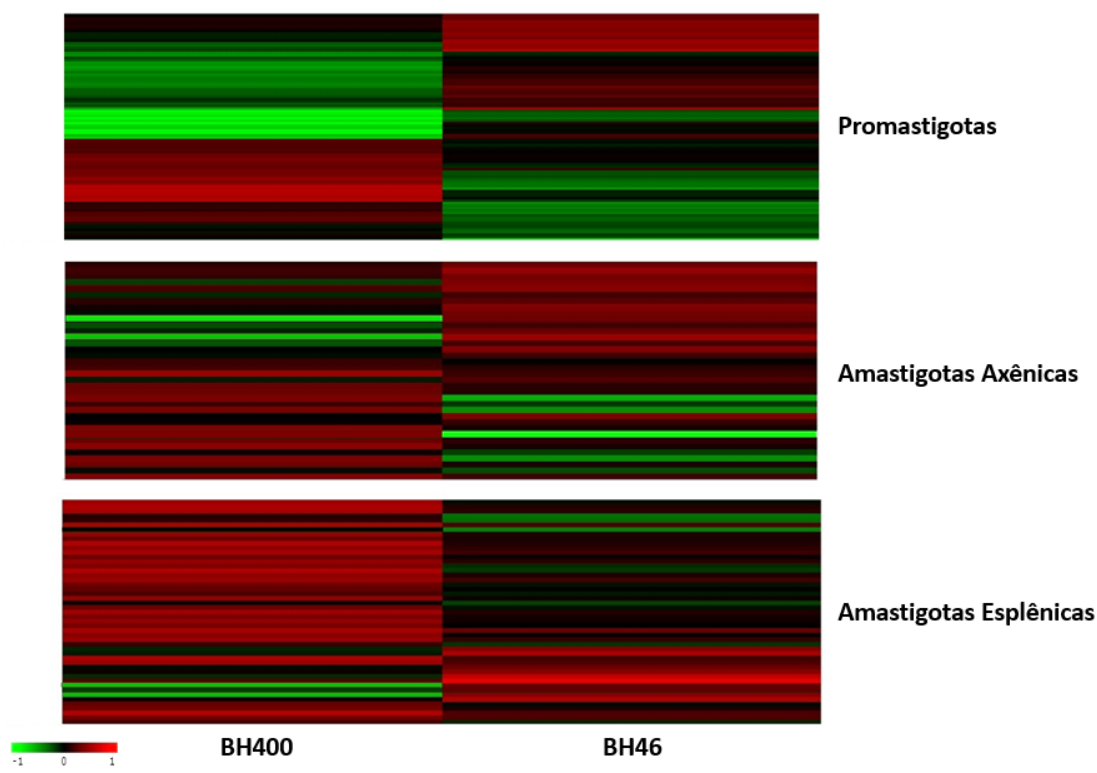


Figura 9: Agrupamento hierárquico (*Pattern Analysis*) dos *spots* selecionados por diferença de intensidade na comparação entre as cepas BH400 e BH46. Os valores de expressão relativa estão exibidos na escala colorimétrica usando o log de abundância padronizado, variando de -1 (regulado-negativamente; verde) para 1 (regulado-positivamente; vermelho). As cepas são mostradas no eixo horizontal e os *spots* são mostrados no eixo vertical.

Os *spots* selecionados por diferença de abundância significativa ($\text{Fold Change} \geq 2$ e $P \leq 0,05$) entre as cepas estão ilustrados na Figura 10. Estes foram retirados dos géis e posteriormente identificados através da Espectrometria de Massas (Figura 10).

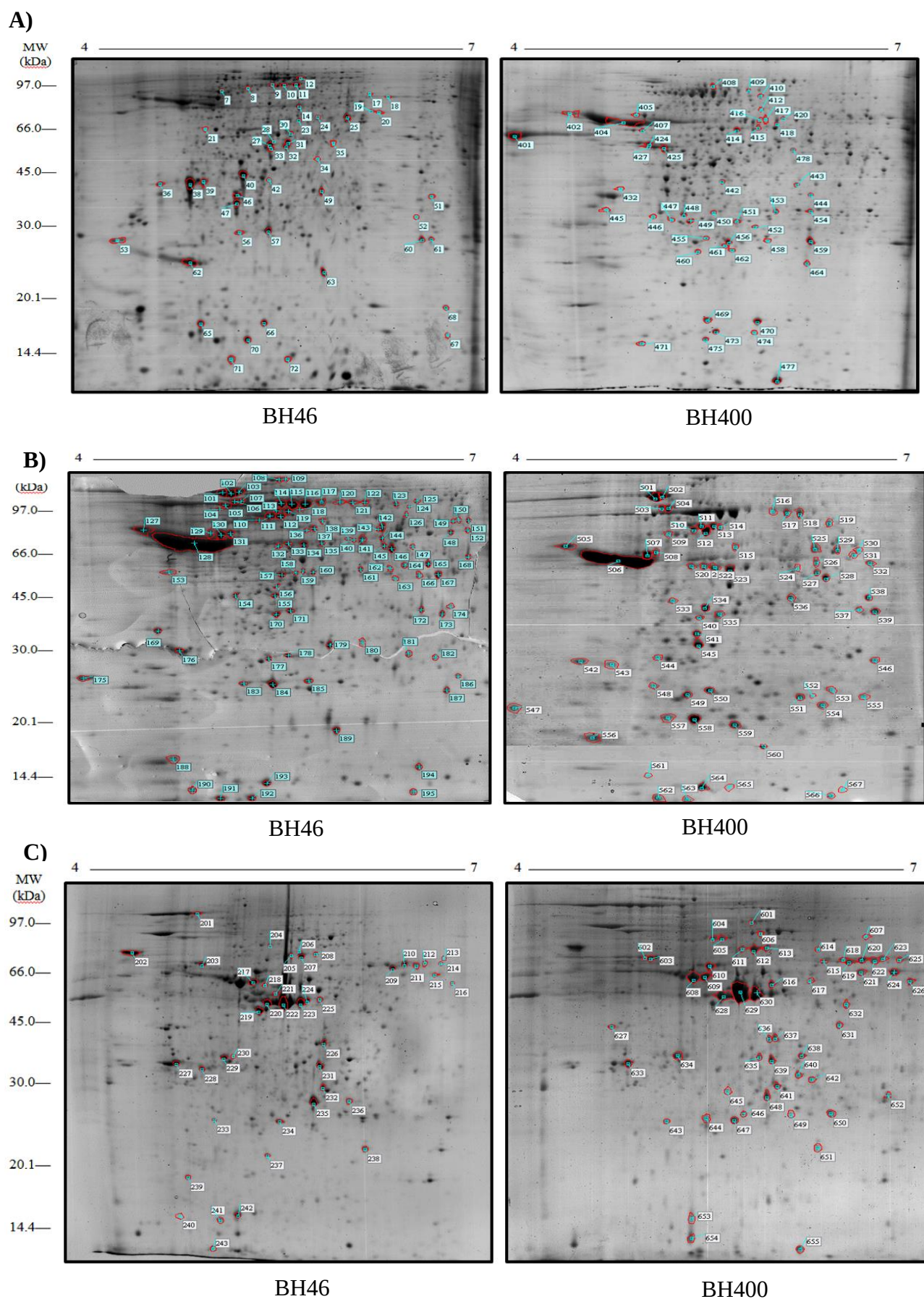


Figura 10: Imagem representativa dos geis 2DE mostrando os *Spots* selecionados através de *One-Way* ANOVA ($P \leq 0,05$) como diferencialmente abundantes (Fold Change ≥ 2) entre as cepas BH46 e

BH400 de *L. infantum* nas formas Promastigotas (A), Amastigotas Axênicas (B) e Amastigotas Esplênicas (C). Foram utilizadas *strips* de 18cm, pH 4 – 7. Cada *spot* recebeu um número de identificação único.

Para os géis da cepa BH46, nas formas Promastigota, Amastigotas Axênica e Esplênica, foram selecionados como sendo estatisticamente significativos 72, 95 e 43 *spots*, respectivamente. Para géis da cepa BH400, as análises estatísticas indicaram 77, 67 e 55 *spots* com diferença de abundância nas formas Promastigota, Amastigotas Axênica e Esplênica, respectivamente. Assim, foram retirados dos géis analisados um total de 409 *spots*, para posterior identificação via Espectrômetro de Massas.

5.2.3 Identificação das Proteínas

5.2.3.1 Differential Gel Electrophoresis (DIGE)

Com um total de 409 *spots* selecionados a partir dos géis DIGE e que foram submetidos à Espectrometria de Massas (MALDI – ToF/ToF), identificamos com sucesso 347 *spots*, o que corresponde a 85% do total analisado. Na Tabela 2 estão representadas as quantidades de *spots* selecionados e identificados a partir de cada cepa e forma, bem como o número de proteínas distintas correspondentes.

Tabela 2: Dados sobre a seleção e identificação dos *spots* marcados com DIGE, através da Espectrometria de Massa:

Cepa	Forma Evolutiva	<i>Spots</i> Totais	<i>Spots</i> selecionados	Quantidade de <i>spots</i> identificados pelo MALDI (%)	Proteínas
BH46	Promastigota	816	72	61 (85%)	53
	Amastigota Axênica	980	95	91 (96%)	97
	Amastigota Esplênica	942	43	35 (81%)	13
BH400	Promastigota	950	77	76 (99%)	74
	Amastigota Axênica	920	67	53 (79%)	52
	Amastigota Esplênica	870	55	31 (56%)	14

Os 347 *spots* que foram identificados com sucesso no MALDI correspondem a 131 proteínas únicas. O maior número de *spots* em relação ao número de distintas proteínas identificadas deve-se ao fato de que algumas proteínas foram encontradas repetidamente em diferentes *spots*, o que pode ocorrer, por exemplo, quando há prováveis isoformas destas proteínas. Além disso, existe a possibilidade de clivagem dessas proteínas durante o processamento das amostras ou ainda, devido às modificações pós-traducionais adicionadas às cadeias polipeptídicas. Essas situações podem alterar a massa molecular e o ponto isoelétrico das proteínas, consequentemente, alterando a posição do spot no gel. Um exemplo é a *Heat-Shock Protein 70* (HSP-70), encontrada repetidas vezes, em diferentes *spots*.

5.2.3.2 Tandem Mass Tag (TMT)

Devido ao número baixo de proteínas identificadas em Amastigota Esplênica na técnica de DIGE, resolvemos complementar nossos resultados com outra técnica de proteômica quantitativa mais sensível, através da marcação de peptídeos por isóbaros pelo kit *Tandem Mass Tag* - TMT®.

Os peptídeos marcados com isóbaros provenientes do kit TMT® foram fracionados por cromatografia líquida, e esta acoplada a um ionizador do tipo electrospray com dois analisadores de massa (LC-ESI-MS/MS) para sequenciamento dos peptídeos.

Foram identificadas 311 proteínas únicas com diferenças quantitativas ($P \leq 0,05$) entre as amostras.

Tabela 3: Dados referentes ao número de proteínas identificadas com diferença de abundância após marcação com isóbaros provenientes do kit TMT nas diferentes formas e cepas de *L. infantum*

Cepa	Forma Evolutiva	Abundância ↑	Abundância ↓	Total
BH46	Promastigota	52	68	120
	Amastigota Axênica	32	139	171
	Amastigota Esplênica	115	42	157
BH400	Promastigota	81	94	175
	Amastigota Axênica	42	130	172
	Amastigota Esplênica	109	36	145

5.3 Proteínas Diferencialmente Abundantes (DIGE + TMT)

Considerando ambas as técnicas de marcação de peptídeos utilizadas (DIGE e TMT), um total de 414 proteínas únicas foram encontradas com diferença de abundância entre as amostras. Podemos observar na Figura 11 a representação gráfica do total de proteínas distintas identificadas em cada cepa nas diferentes formas evolutivas estudadas. Observa-se em Promastigota, 114 proteínas com aumento de abundância na cepa BH400 e 75 proteínas aumentadas em BH46. Com abundância diminuída, foram observadas 115 proteínas em BH400 e 106 em BH46. Em Amastigota Axênica, foram observadas 66 proteínas aumentadas em BH400 e 90 em BH46. Por outro lado, 178 proteínas foram encontradas com abundância diminuída em BH400 e 152 em BH46. Por fim em Amastigota Esplênica, foram observadas 117 proteínas com abundância aumentada em BH400 e 123 proteínas em BH46. Com diminuição da abundância, foram encontradas 79 e 99 proteínas em BH400 e BH46, respectivamente (Figura 11).

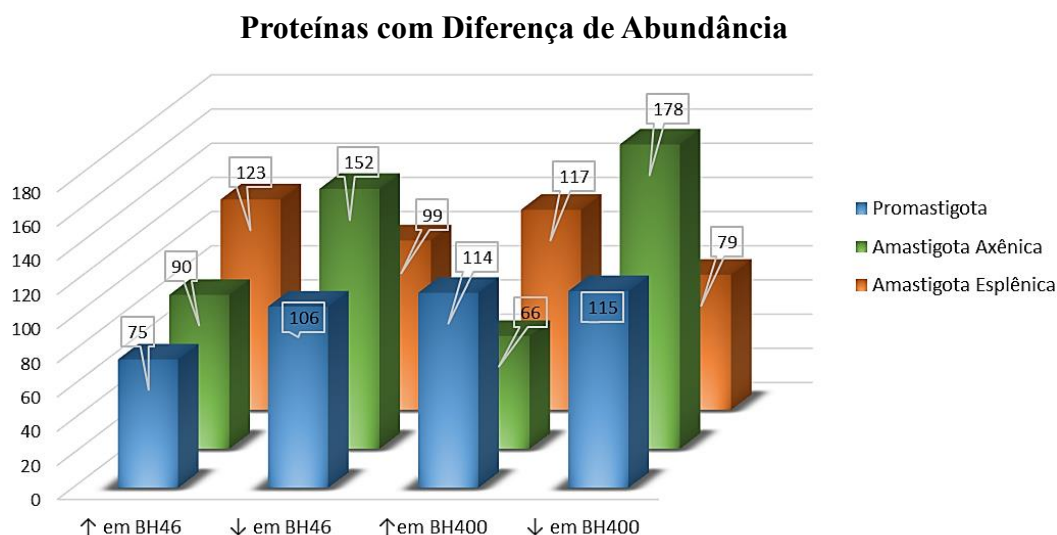


Figura 11: Gráfico representativo do total de proteínas únicas com diferença de abundância entre as amostras estudadas. Amostras foram marcadas com DIGE e TMT e identificadas por Espectrometria de Massa do tipo MALDI e LC-MS/MS, respectivamente. Em azul, promastigota; Verde, Amastigota Axênica e Marrom, Amastigota Esplênica.

5.4 Análise Comparativa

Após a identificação das proteínas com diferença de abundância, foi confeccionado um diagrama de Venn a fim de verificarmos a complementariedade das técnicas de análise quantitativa de proteínas. Foi observado que 52 proteínas (12,6%) foram selecionadas em ambas as técnicas; outras 79 (19%) foram selecionadas exclusivamente na técnica DIGE e finalmente, 283 proteínas (68,4%) foram identificadas exclusivamente pela técnica TMT (Figura 12). Portanto, a utilização das duas técnicas atuou de forma complementar e permitiu ampliar o universo de proteínas com diferença na abundância entre as amostras, uma vez que cada uma delas exibem vantagens e limitações técnicas.

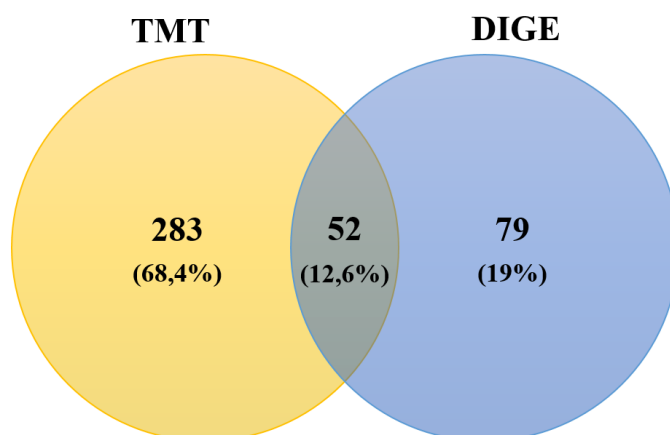


Figura 12: Diagrama de Venn representativo da complementariedade das técnicas de TMT e DIGE. São mostrados os números totais de proteínas identificadas em cada técnica bem como as encontradas simultaneamente por ambas as técnicas.

5.4.1 Promastigotas

Para verificarmos a distribuição da abundância global das proteínas encontradas na forma Promastigota de cada cepa, foi confeccionado um gráfico de dispersão (Figura 13).

Podemos observar uma distribuição linear no gráfico de dispersão das abundâncias das proteínas identificadas em Promastigotas de cada cepa. Em BH400 há uma quantidade superior de proteínas com fold-change maior que 5, em relação à BH46.

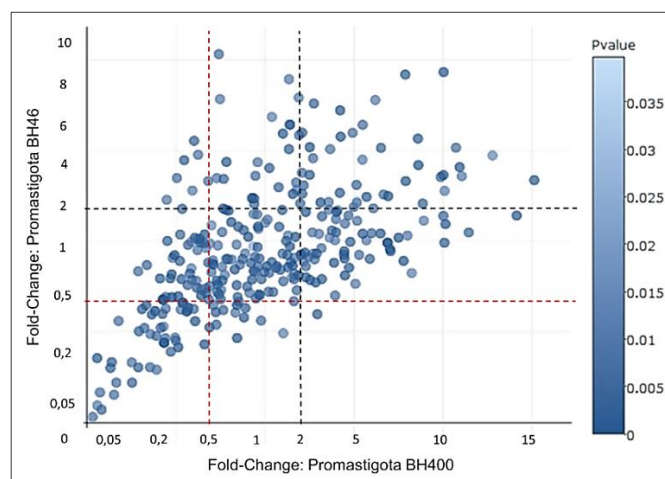


Figura 13: Gráfico de dispersão da abundância global das proteínas identificadas na forma Promastigota. Valores de Fold Change $\leq 0,5$ = Abundância Diminuída; Fold Change ≥ 2 = Abundância Aumentada; Fold Change $0,6 \sim 1,9$ = Sem Alteração. Valor de $P \leq 0,05$.

Após a identificação das proteínas por Espectrometria de Massa, algumas delas foram identificadas simultaneamente em mais de um *spot* no gel bidimensional. Presume-se que apesar de corresponderem as mesmas proteínas, elas podem desempenhar funções diferentes em cada cepa, uma vez que essas moléculas apresentam alterações na massa molecular e/ou ponto isoelétrico. O que pode ser decorrente de vários fatores como clivagem, associações ou modificações pós-traducionais, dentre outros. Além disso, algumas dessas proteínas pertencem a grandes famílias proteicas, e/ou proteínas com alta abundância e também aquelas compostas de duas ou mais subunidades ou cadeias polipeptídicas, que durante o preparo da amostra podem sofrer quebras ao longo da estrutura, provocando a separação das subunidades ou das cadeias polipeptídicas, levando ao aparecimento da mesma proteína em distintos *spots* nos géis 2-DE, independente do fenótipo que se esteja estudando (Petrak *et al*, 2008).

No Apêndice 1 estão descritas as proteínas encontradas com diferença de abundância, na forma Promastigota e seus respectivos valores de fold-change. A fim de facilitar a visualização dos dados obtidos, construímos Diagramas de Venn comparativo entre as cepas BH400 e BH46 de *L. infantum* contendo a quantidade de proteínas com abundância diminuída e aumentada na forma Promastigota (Figura 14). Podemos observar que das 159 com abundância diminuída, 46 (28,9%) delas foram encontradas somente em BH46, 56 (35,6%) em BH400 e 57 (35,7%) são compartilhadas pelas duas cepas. Aquelas que apresentaram aumento de abundância são 148 no total, e estão distribuídas da seguinte forma: 36 (24,3%), 35 (23,6%) e 77 (52%) em BH46, BH400 e em ambas as cepas, respectivamente.

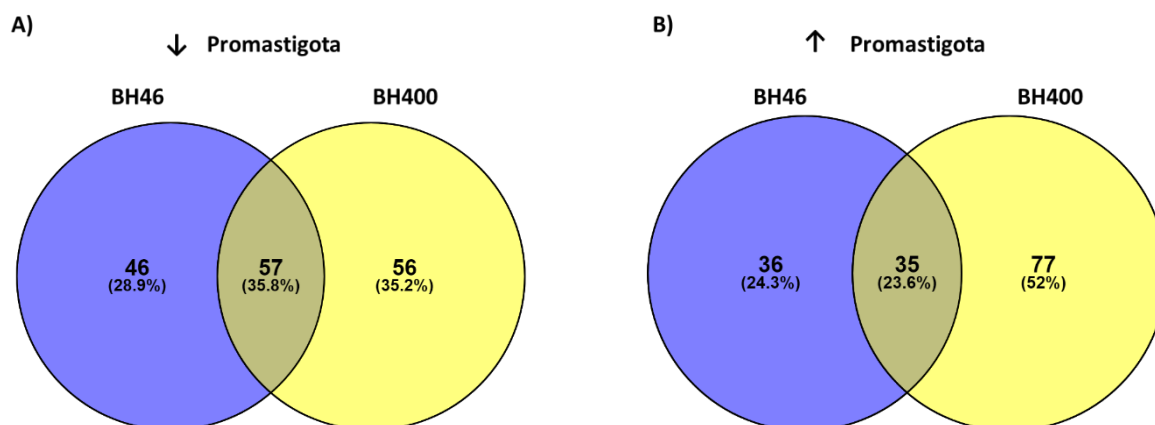


Figura 14: Diagramas de Venn representando o número de proteínas identificadas com (A) abundância diminuída e (B) abundância aumentada na forma Promastigota das cepas BH46 e BH400 de *L. infantum*.

Categorização Funcional

As proteínas identificadas de Promastigota apresentando diferenças na abundância, foram agrupadas de acordo com os processos biológicos que participam. A categorização funcional foi realizada através do consórcio “Gene Ontology”, utilizando a plataforma de bioinformática “Blast2GO Pro” (BioBam) (Tabela 4).

Tabela 4: Categorização funcional das proteínas: As proteínas encontradas com diferença de abundância na forma Promastigota das duas cepas, foram categorizadas de acordo com o Processo Biológico nos quais atuam, através do consórcio Gene Ontology - <http://www.geneontology.org/>.

Processos Biológicos	BH46	BH400
<i>Metabolismo</i>	2,3-bisphosphoglycerate-independent phosphoglycerate mutase 2-oxoglutarate dehydrogenase, E2 component, dihydrolipoamide succinyltransferase	2-oxoglutarate dehydrogenase, E2 component, dihydrolipoamide succinyltransferase 3,2-trans-enoyl-CoA isomerase, mitochondrial precursor

3. 3,2-trans-enoyl-CoA isomerase, mitochondrial precursor	3. 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase
4. 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase	4. 3-ketoacyl-CoA thiolase
5. 3-hydroxyisobutyryl-coenzyme a hydrolase-like protein	5. adenosine kinase
6. activated protein kinase c receptor (LACK)	6. aldose 1-epimerase
7. aldose 1-epimerase	7. ATPase alpha subunit
8. ATPase beta subunit	8. ATPase beta subunit
9. dihydrolipoamide acetyltransferase precursor	9. ATP-dependent phosphofructokinase
10. fatty acid elongase	10. citrate synthase
11. glutamine synthetase	11. galactokinase-like protein
12. glycosomal malate dehydrogenase	12. glutamine synthetase
13. glycosomal phosphoenolpyruvate carboxykinase	13. glycosomal malate dehydrogenase
14. hexokinase	14. hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase
15. iron superoxide dismutase	15. malate dehydrogenase
16. malate dehydrogenase	16. MAP kinase
17. MAP kinase	17. mitochondrial associated ribonuclease
18. mitochondrial associated ribonuclease	18. mitochondrial malate dehydrogenase
19. mitochondrial malate dehydrogenase	19. prostaglandin f2-alpha synthase/D-arabinose dehydrogenase
20. protein tyrosine phosphatase-like protein	20. P-type H –ATPase
21. pyruvate dehydrogenase E1 beta subunit	21. pyruvate dehydrogenase E1 beta subunit
22. pyruvate dehydrogenase E1 component alpha subunit	22. pyruvate dehydrogenase E1 component alpha subunit
23. pyruvate phosphate dikinase	23. S-adenosylhomocysteine hydrolase
24. S-adenosylhomocysteine hydrolase	24. serine/threonine-protein kinase,protein kinase
25. S-adenosylmethionine synthetase	25. transaldolase
26. succinyl-CoA ligase [GDP-forming] beta-chain	26. UDP-glucose pyrophosphorylase
27. transaldolase	27. vacuolar ATP synthase subunit b
28. UDP-glucose pyrophosphorylase	

	29. vacuolar ATP synthase subunit b	
<i>Tradução</i>	1. 40S ribosomal protein S15	1. 40S ribosomal protein S12
	2. 40S ribosomal protein S24e	2. 40S ribosomal protein S15
	3. 40S ribosomal protein S3A	3. 40S ribosomal protein S18
	4. 40S ribosomal protein AS	4. 40S ribosomal protein S2
	5. 60S acidic ribosomal protein P2	5. 40S ribosomal protein S21
	6. 60S ribosomal protein L10	6. 40S ribosomal protein S23
	7. 60S ribosomal protein L22	7. 40S ribosomal protein S27-1
	8. 60S Ribosomal protein L36	8. 40S ribosomal protein S33
	9. 60S ribosomal protein L37	9. 40S ribosomal protein S5
	10. conserved hypothetical protein LinJ.32.2330	10. 40S ribosomal protein S6
	11. eukaryotic initiation factor 4 ^a	11. 40S ribosomal protein AS
	12. eukaryotic translation initiation factor 3 subunit	12. 60S acidic ribosomal protein P2
	13. eukaryotic translation initiation factor 3 subunit 7-like protein	13. 60S ribosomal protein L10
	14. eukaryotic translation initiation factor 6 (eIF-6)	14. 60S ribosomal protein L13
	15. lysyl-tRNA synthetase	15. 60S ribosomal protein L13a
	16. ribosomal protein S25	16. 60S ribosomal protein L18
	17. translation elongation factor 1-beta	17. 60S ribosomal protein L19
		18. 60S ribosomal protein L22
		19. 60S ribosomal protein L23
		20. 60S ribosomal protein L27A/L29
		21. 60S ribosomal protein L28
		22. 60S ribosomal protein L32
		23. 60S ribosomal protein L34
		24. 60S Ribosomal protein L36
		25. 60S ribosomal protein L37
		26. 60S ribosomal protein L5
		27. 60S ribosomal protein L6
		28. conserved hypothetical protein LinJ.32.2330
		29. elongation factor 1-alpha
		30. elongation factor 2
		31. eukaryotic initiation factor 4 ^a
		32. eukaryotic initiation factor 5a
		33. eukaryotic translation initiation factor 3 subunit

		34. eukaryotic translation initiation factor 3 subunit 7-like protein 35. eukaryotic translation initiation factor 6 (eIF-6) 36. lysyl-tRNA synthetase 37. ribosomal protein L24 38. ribosomal protein L27 39. ribosomal protein L3 40. ribosomal protein S20 41. ribosomal protein S25 42. ribosomal protein S6,NPH2/RS6-like protein 43. ribosomal protein S7 44. translation elongation factor 1-beta
<i>Resposta a Estresse</i>	1. 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase 2. cytochrome c 3. cytochrome c oxidase subunit V 4. d-isomer specific 2-hydroxyacid dehydrogenase- protein 5. glucose-regulated protein 78 6. glutathione peroxidase-like protein 7. glycosomal malate dehydrogenase 8. heat shock protein DNAJ 9. iron superoxide dismutase 10. kinetoplastid membrane protein-11 11. malate dehydrogenase 12. mitochondrial malate dehydrogenase 13. NADH-dependent fumarate reductase protein 14. peroxidoxin 15. protein disulfide isomerase 16. pyrroline-5-carboxylate reductase 17. pyruvate dehydrogenase E1 beta subunit	1. 1,2-Dihydroxy-3-keto-5-methylthiopentene dioxygenase 2. 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase 3. conserved hypothetical protein LinJ.18.0210 4. cytochrome c 5. cytochrome c oxidase subunit IV 6. dihydrolipoamide dehydrogenase 7. d-isomer specific 2-hydroxyacid dehydrogenase- protein 8. glucose-regulated protein 78 9. glycosomal malate dehydrogenase 10. heat shock protein DNAJ 11. kinetoplastid membrane protein-11 12. malate dehydrogenase 13. mitochondrial malate dehydrogenase 14. NADH-cytochrome b5 reductase 15. NADH-dependent fumarate reductase protein 16. NADP-dependent alcohol dehydrogenase

	18. pyruvate dehydrogenase E1 component alpha subunit 19. reiske iron-sulfur protein precursor 20. ribonucleoprotein p18, mitochondrial precursor 21. S-adenosylhomocysteine hydrolase 22. stress-inducible protein STI1 homolog 23. trypanothione reductase 24. tryparedoxin 25. tryparedoxin peroxidase	17. oxidoreductase 18. peroxidoxin 19. protein disulfide isomerase 20. pyruvate dehydrogenase E1 beta subunit 21. pyruvate dehydrogenase E1 component alpha subunit 22. reiske iron-sulfur protein precursor 23. ribonucleoprotein p18, mitochondrial precursor 24. S-adenosylhomocysteine hydrolase 25. stress-inducible protein STI1 homolog 26. trypanothione reductase 27. tryparedoxin 28. tryparedoxin peroxidase
<i>Biosíntese</i>	1. fatty acid elongase 2. glutamine synthetase 3. phosphomannomutase 4. pyrroline-5-carboxylate reductase 5. S-adenosylmethionine synthetase 6. spermidine synthase	1. 1,2-Dihydroxy-3-keto-5-methylthiopentene dioxygenase 2. 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase 3. adenosine kinase 4. conserved hypothetical protein LinJ.24.2200 5. GDP-mannose pyrophosphorylase 6. glutamine synthetase 7. phosphomannomutase 8. spermidine synthase 9. sterol 24-c-methyltransferase
<i>Enovelamento de Proteína</i>	1. 10 kDa heat shock protein 2. calreticulin 3. glucose-regulated protein 78 4. heat shock protein DNAJ 5. peptidylprolyl isomerase-like protein histone H2A	1. 10 kDa heat shock protein 2. cyclophilin 2 3. cyclophilin a 4. glucose-regulated protein 78 5. heat shock protein DNAJ 6. heat shock 70-related protein 1, mitochondrial precursor

		- heat shock protein 70 - peptidylprolyl isomerase-like protein histone H2A
<i>Proteólise</i>	20S proteasome subunit alpha 5 - GP63, leishmanolysin - hs1vu complex proteolytic subunit - metallo-peptidase, Clan MA(E), family 32 - metallo-peptidase, Clan MA(E), Family M32 - proteasome alpha 1 subunit - proteasome alpha 2 subunit - proteasome alpha 5 subunit - proteasome alpha 7 subunit - proteasome beta 3 subunit	20S proteasome subunit alpha 5 - calpain-like cysteine peptidase - calpain-like cysteine peptidase, Clan CA, family C2 - cytoskeleton-associated protein CAP5.5, cysteine peptidase, Clan CA, family C2 - GP63, leishmanolysin - metallo-peptidase, Clan MA(E), family 32 - proteasome alpha 1 subunit - proteasome alpha 2 subunit - proteasome alpha 3 subunit - proteasome alpha 5 subunit - proteasome alpha 7 subunit - proteasome regulatory non-ATP-ase subunit
<i>Organização do Citoesqueleto</i>	- ADF/Cofilin - cofilin-like protein - kinesin - kinetoplastid membrane protein-11 - trypanin-like protein	- ADF/Cofilin - cofilin-like protein - kinesin - kinetoplastid membrane protein-11 - trypanin-like protein
<i>Biogênese Ribossomal</i>	40S ribosomal protein SA 60S acidic ribosomal subunit protein - eukaryotic translation initiation factor 6 (eIF-6)	40S ribosomal protein SA 60S acidic ribosomal subunit protein - eukaryotic translation initiation factor 6 (eIF-6)
<i>Transporte</i>	- ATP synthase F1 subunit gamma protein - ATP synthase, epsilon chain	- ATP synthase F1 subunit gamma protein - ATPase beta subunit

	3. ATPase beta subunit 4. GTP binding protein 5. metallo-peptidase, Clan MF, Family M17 6. vacuolar ATP synthase subunit b	3. conserved hypothetical protein LinJ.36.7070 4. glucose transporter, lmg1 5. glucose transporter, lmg2 6. glucose transporter, lmg3 7. GTP binding protein 8. metallo-peptidase, Clan MF, Family M17 9. P-type H -ATPase 10. vacuolar ATP synthase subunit b 11. vacuolar-type proton translocating pyrophosphatase 1
<i>Transporte Transmembrana</i>	1. ADP,ATP carrier protein 1, mitochondrial precursor,ADP/ATP translocase 1 2. conserved hypothetical protein LinJ.36.0510 3. cytochrome c oxidase subunit V 4. metallo-peptidase, Clan MF, Family M17 5. reiske iron-sulfur protein precursor	1. ADP,ATP carrier protein 1, mitochondrial precursor,ADP/ATP translocase 1 2. ATPase alpha subunit 3. cytochrome c oxidase subunit IV 4. glucose transporter, lmg1 5. glucose transporter, lmg2 6. glucose transporter, lmg3 7. metallo-peptidase, Clan MF, Family M17 8. P-type H -ATPase 9. reiske iron-sulfur protein precursor 10. vacuolar-type proton translocating pyrophosphatase 1
<i>Transdução de Sinal</i>	1. ADP-ribosylation factor 2. rab1 small GTP-binding protein 3. rab7 GTP binding protein 4. ras-related rab-4	1. ADP-ribosylation factor 2. rab1 small GTP-binding protein 3. rab7 GTP binding protein 4. ras-related rab-4
<i>Processo Metabólico de Ácidos Nucleicos</i>	1. ATP-dependent RNA helicase 2. replication factor A, 51kDa subunit 3. U3 small nucleolar ribonucleoprotein protein MPP10	1. ATP-dependent DEAD/H RNA helicase 2. ATP-dependent RNA helicase 3. U3 small nucleolar ribonucleoprotein protein MPP10

		4. U3 snoRNA-associated protein UTP11
<i>Processo de Modificação de Proteínas</i>	1. MAP kinase 2. NADH-dependent fumarate reductase protein 3. peptidylprolyl isomerase-like protein 4. protein tyrosine phosphatase-like protein	1. cyclophilin 2 2. cyclophilin a 3. eukaryotic initiation factor 5a 4. MAP kinase 5. NADH-dependent fumarate reductase protein 6. peptidylprolyl isomerase-like protein
<i>Organização de Componentes Celulares</i>		1. glycosomal membrane protein 2. nucleosome assembly protein-like protein
<i>Regulação da Expressão Gênica</i>	1. heat shock protein DNAJ 2. mitochondrial RNA binding protein 1, MRP1, gBP21	1. heat shock protein DNAJ 2. la RNA binding protein 3. mitochondrial RNA binding protein 1, MRP1, gBP21 4. mitochondrial RNA binding protein 2, MRP2, gBP25
<i>Adesão Celular</i>	1. GP63, leishmanolysin 2. soluble promastigote surface antigen PSA-38S 3. Surface membrane glycoprotein GP46/M-2	1. GP63, leishmanolysin 2. soluble promastigote surface antigen PSA-38S 3. Surface membrane glycoprotein GP46/M-2
<i>Gliconeogênese</i>	1. 2,3-bisphosphoglycerate-independent phosphoglycerate mutase 2. glycosomal phosphoenolpyruvate carboxykinase	1. 2,3-bisphosphoglycerate-independent phosphoglycerate mutase
<i>Processo Glicolítico</i>	1. 2,3-bisphosphoglycerate-independent phosphoglycerate mutase 2. Enolase 3. fructose-1,6-bisphosphate aldolase 4. hexokinase 5. phosphoglycerate kinase C, glycosomal	1. 2,3-bisphosphoglycerate-independent phosphoglycerate mutase 2. ATP-dependent phosphofructokinase 3. Enolase 4. fructose-1,6-bisphosphate aldolase

Os processos biológicos foram separados de acordo com a quantificação da abundância das proteínas (abundância diminuída e aumentada), em ambas as cepas (Figura 15). Podemos observar que a categoria funcional com maior representatividade em *Promastigota* de BH46 com abundância diminuída foi o processo biológico de Resposta a Estresse (22%), seguido do processo de Transporte transmembrana de íons de Hidrogênio (15%), Proteólise envolvida no processo catabólico de proteínas (15%), Fosforilação (9%) e Tradução (9%). Ainda em BH46 com abundância aumentada, o processo biológico mais representado foi a Resposta a Estresse, com 22%. Todos os outros processos foram representados com 6% cada (Figura15, A e B).

Em BH400, a categoria funcional com maior representatividade apresentando diminuição de abundância foi o processo biológico de Tradução (19%) e Resposta a Estresse (19%), seguidos por Fosforilação (15%) e Biogênese de Ribossomo (13%). Os processos biológicos com abundância aumentada em BH400 mais representados foram: Transporte transmembrana de íons de Hidrogênio (25%) e Tradução (25%), seguidos por Resposta a Estresse (22%) e Regulação de processos celulares (5%) (Figura15, C e D).

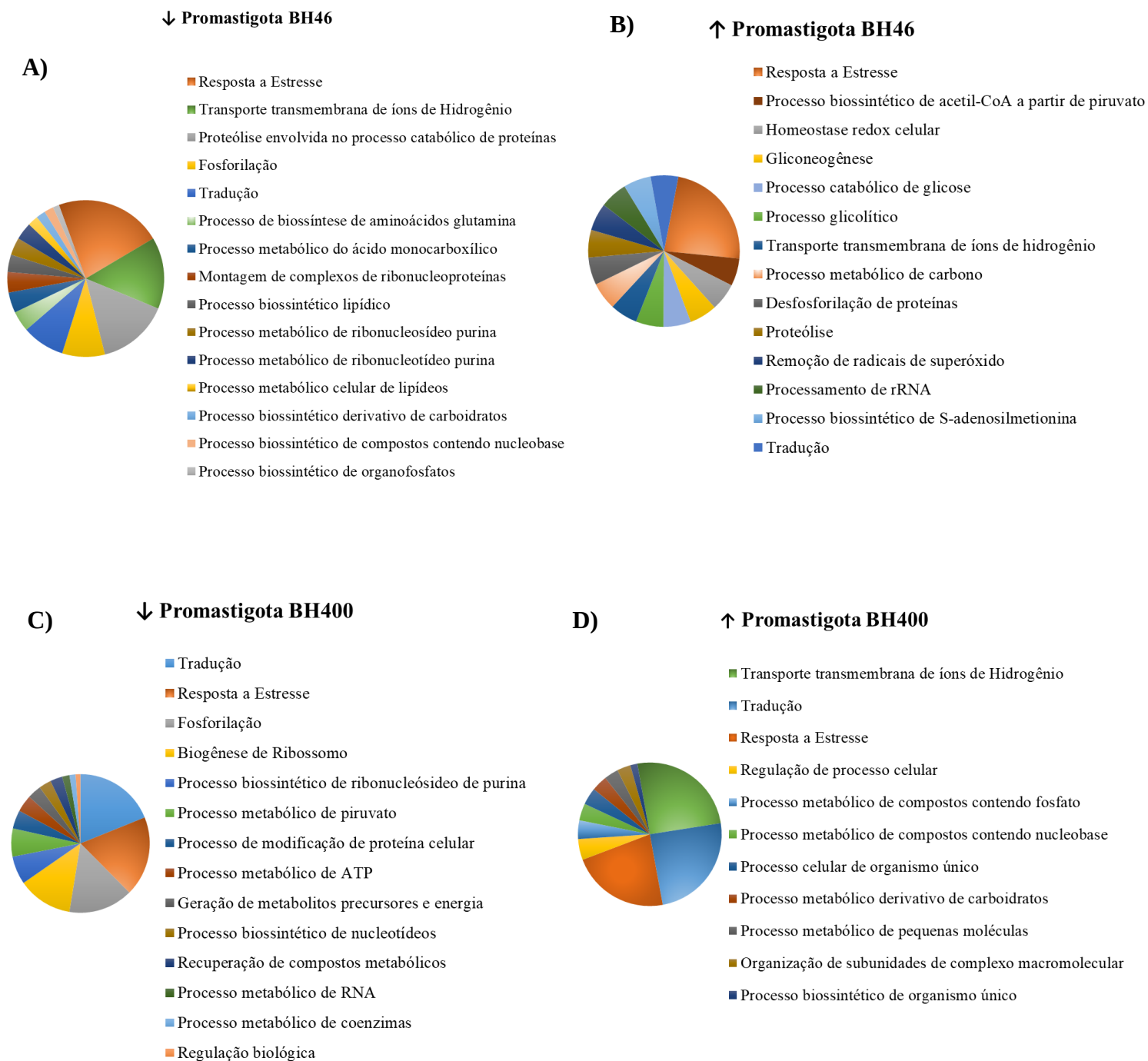


Figura 15: Categorização Funcional das proteínas da forma Promastigota, diminuídas em BH46 (A), aumentadas em BH46 (B), diminuídas em BH400 (C) e aumentadas em BH400 (D).

Predição de Interação Proteína-Proteína

Para identificarmos possíveis interações entre as proteínas identificadas, foi realizada uma análise de predição das interações proteicas, utilizando o banco de dados *String 10.0 (Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins* – www.string-db.org). Foram realizadas predição das interações entre as proteínas com diferença de abundância (aumentadas e diminuídas) na forma Promastigota das cepas BH 46 (Figura 16) e da cepa BH400 (Figura 17). As redes obtidas foram posteriormente editadas no programa *Cytoscape 3.4.0* para a inserção dos valores de fold-change para cada proteína, afim de inserir uma escala colorimétrica de abundância na rede de interação gerada.

Foi muito interessante observar o grande número de interações que são preditas. Destacamos nas Figuras 16 e 17 em um círculo na cor laranja um grande agrupamento de proteínas ribossomais e reguladoras da tradução interagindo nas redes preditas de ambas as cepas. Observa-se que esse agrupamento apresenta um maior número de proteínas com aumento de abundância em BH400 quando comparada ao agrupamento na cepa BH46, onde mais da metade dessas proteínas apresentam diminuição. Destacamos ainda que a interação dessas proteínas é mais acentuada em BH400 e mais dispersa em BH46.

Em BH400, observa outro agrupamento chama atenção, círculo 2, em cor laranja, Figura 17, e é composto por proteínas com aumento de abundância que compõem o complexo do Proteasoma. Também nos chamou atenção as redes de interações formadas por proteínas pertencentes ao processo biológico de Resposta ao Estresse, de acordo com o Gene Ontology, foram destacadas em azul.

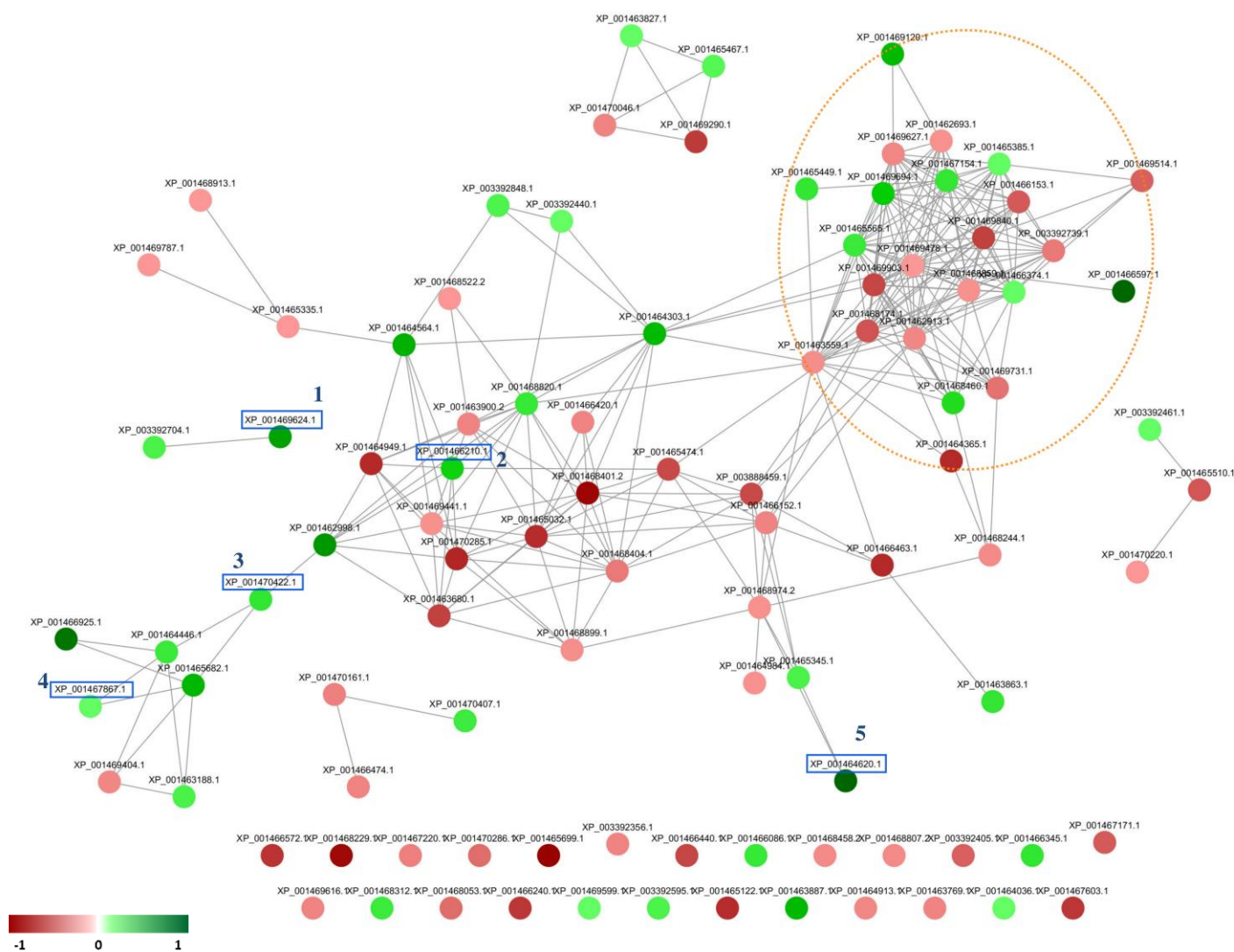


Figura 16: Predição de interação das proteínas identificadas que apresentaram diferença na abundância na forma Promastigota da cepa BH46. Os valores de abundância relativa estão exibidos na escala colorimétrica usando o log de abundância padronizado, variando de -1 (regulado negativamente; vermelho) para 1 (regulado positivamente; verde). As proteínas destacadas em azul, são proteínas pertencentes ao processo biológico de Resposta ao Estresse, de acordo com o Gene Ontology. São elas: 1- S-adenosilhomocisteína hidrolase; 2- Piruvato Desidrogenase E1 subunidade beta; 3- Glutathione Peroxidase-like; 4- Superóxido Dismutase de ferro; 5- Citocromo C. Em laranja observa-se um agrupamento de proteínas ribossomais e reguladoras da tradução que se interagem.

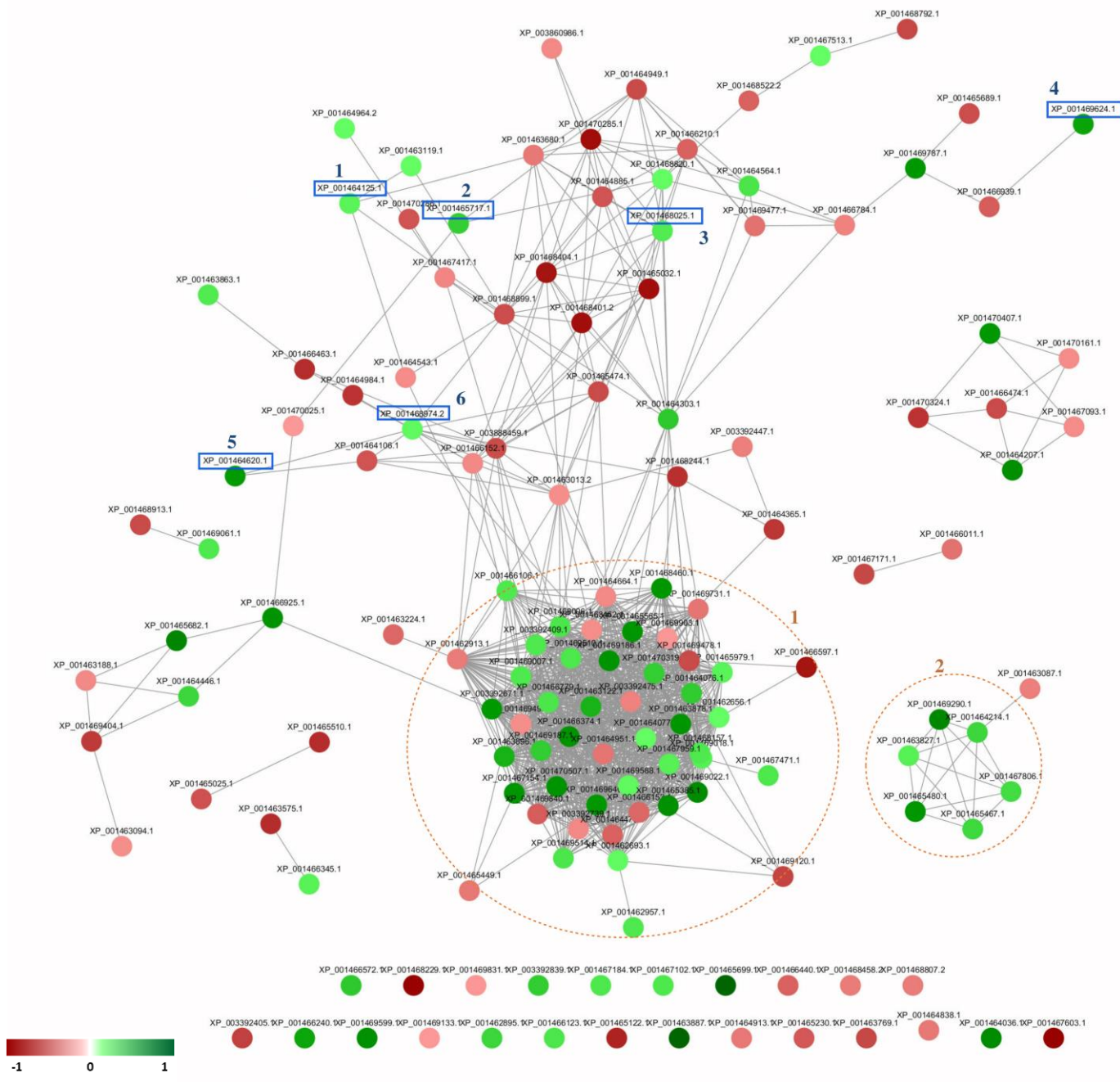


Figura 17: Predição de interação das proteínas identificadas que apresentaram diferença na abundância na forma Promastigota da cepa BH400. Os valores de abundância relativa estão exibidos na escala colorimétrica usando o log de abundância padronizado, variando de -1 (regulado negativamente; vermelho) para 1 (regulado positivamente; verde). As proteínas destacadas em azul, são proteínas pertencentes ao processo biológico de Resposta ao Estresse, de acordo com o Gene Ontology. São elas: 1- NADH-Citocromo b5 Redutase; 2- NADP- desidrogenase álcool dependente; 3- Dihidrolipoamido desidrogenase; 4- S-adenosilhomocisteína hidrolase; 5- Cytochrome C; 6- Proteína Precursora de Ferro-Enxofre

Reiske. Destacados em laranja: 1- Agrupamento de proteínas ribossomais e reguladoras da tradução que se interagem; 2- Proteínas que participam do complexo do Proteasoma.

Processos Biológicos Enriquecidos

Para saber quais os processos biológicos mais significativos presentes nas redes de interações, foi avaliada a presença de processos biológicos enriquecidos das proteínas encontradas através da ferramenta BINGO, implementada no programa *Cytoscape* 3.4.0 e foram considerados significativos os processos biológicos com valor de P-corrigido menor que 0,05 (Figura 18).

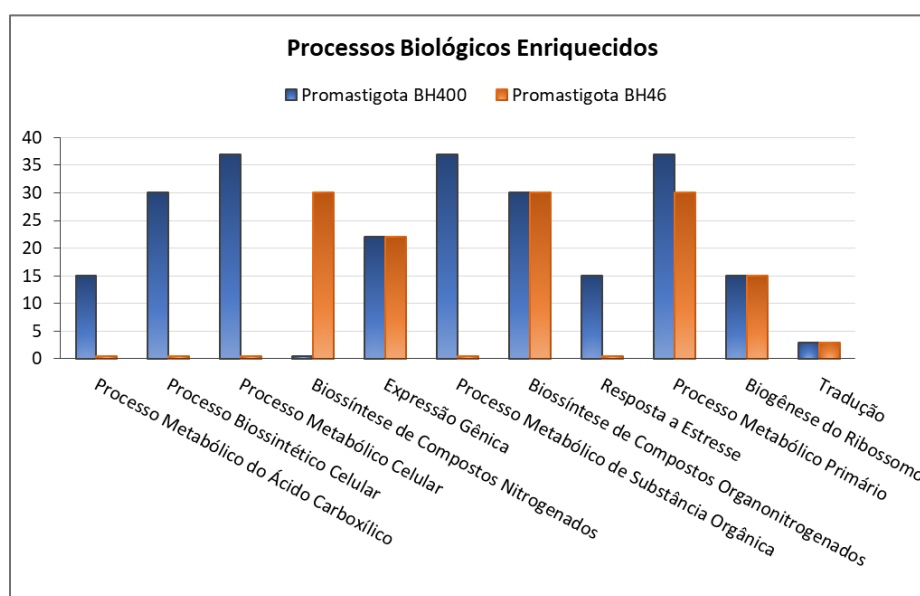


Figura 18: Processos Biológicos Enriquecidos das proteínas diferencialmente abundantes na forma Promastigota das cepas BH46 e BH400 de *L. infantum*. Foi utilizado a ferramenta BINGO implementado no programa *Cytoscape* 3.4.0. Foram considerados significativos os processos biológicos com valor de P-corrigido menor que 0,05.

Os processos biológicos enriquecidos mais representados em Promastigota da cepa BH400 quando comparados a cepa BH46, foram: Processo Metabólico de Ácido Carboxílico; Processo de Biossíntese Celular; Processo Metabólico Celular; Processo Metabólico de Substância Orgânica; Processo Metabólico Primário e Processo de

Resposta a Estresse. Apenas um processo biológico enriquecido estava mais representado em BH46 quando comparado a BH400, o Processo de Biossíntese de Compostos Nitrogenados.

5.4.2 Amastigotas Axênicas

Assim como realizado para a forma Promastigota, também foi confeccionado um gráfico de dispersão das abundâncias das proteínas encontradas na forma Amastigota Axênica de cada cepa (Figura 19).

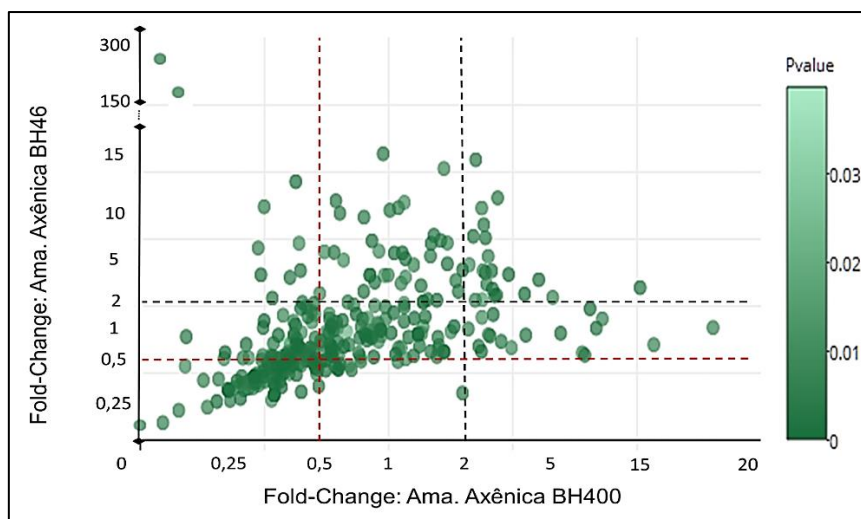


Figura 19: Gráfico de dispersão da abundância global das proteínas identificadas na forma Amastigota Axênica. Valores de Fold Change $\leq 0,5$ = Abundância Diminuída; Fold Change ≥ 2 = Abundância Aumentada; Fold Change 0,6 ~ 1,9 = Sem Alteração.

No gráfico de dispersão podemos observar uma grande quantidade de proteínas com fold-change inferior à 0,5 em ambas as cepas. Além disso, foram encontradas algumas proteínas com fold-change superior a 150 na cepa BH46. São elas: Proteína Conservada Hipotética LinJ.23.0090, Proteína Disulfide Isomerase e S-adenosilmetionina Sintetase.

No Apêndice 2 estão descritas as proteínas encontradas com diferença de abundância nas cepas, na forma Amastigota Axênica e seus respectivos valores de fold-

change. Assim como em Promastigota, descrita anteriormente, algumas proteínas foram identificadas em mais de um spot no gel, apresentando diferença na massa molecular e no ponto isoelétrico, podendo ter a função biológica afetada.

Para as proteínas com abundância diminuída e aumentada em ambas as cepas, também foram construídos Diagramas de Venn comparativo entre as cepas BH400 e BH46 de *L. infantum* (Figura 20). De acordo com o diagrama das proteínas com abundância diminuída, 42 (19,4%) delas foram encontradas somente em BH46, 65 (30,1%) em BH400 e 109 (50,5%) são compartilhadas pelas duas cepas, perfazendo um total de 216 proteínas. Aquelas que apresentaram aumento de abundância, totalizam 121 proteínas, sendo 56 (46,3%) encontradas apenas em BH46, 38 (31,4%) em BH400 e 27 (22,3%) encontradas em ambas as cepas.

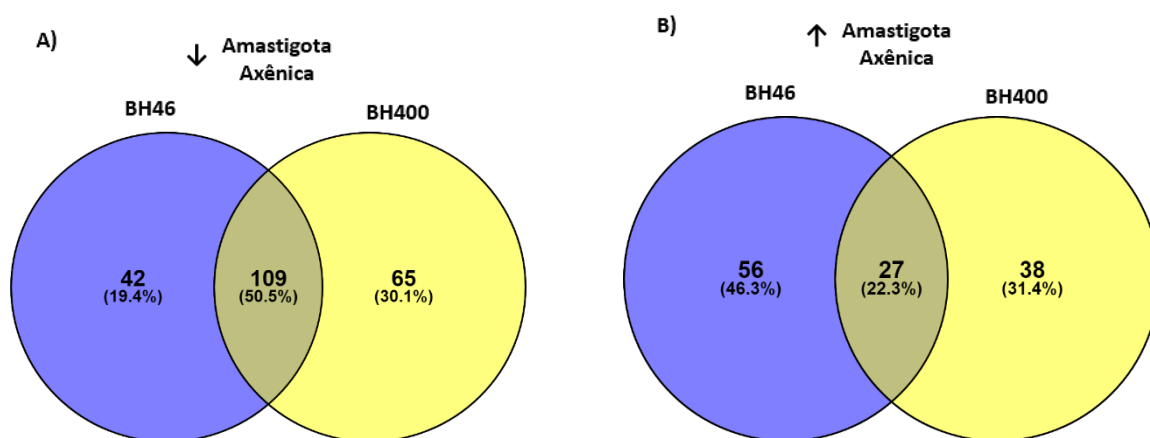


Figura 20: Diagramas de Venn representando o número de proteínas identificadas com (A) abundância diminuída e (B) abundância aumentada na forma Amastigota Axênica das cepas BH46 e BH400 de *L. infantum*.

Categorização Funcional

As proteínas identificadas para a forma Amastigota Axênica também foram agrupadas de acordo com os processos biológicos em que participam. A categorização foi realizada de acordo com o consórcio “Gene Ontology” através da plataforma de bioinformática “Blast2GO Pro” (Tabela 5).

Tabela 5: Categorização funcional das proteínas: As proteínas encontradas com diferença de abundância na forma Amastigota Axênica, foram categorizadas de acordo com o Processo Biológico nos quais atuam, através do consórcio Gene Ontology - <http://www.geneontology.org/>.

Processos Biológicos	BH46	BH400
<i>Metabolismo</i>	1. 2,3-bisphosphoglycerate-independent phosphoglycerate mutase 2. 2-oxoisovalerate dehydrogenase alpha subunit 3. 3,2-trans-enoyl-CoA isomerase, mitochondrial precursor 4. 3-hydroxyisobutyryl-coenzyme a hydrolase-like protein 5. 6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating 6. acetyl-CoA synthetase 7. activated protein kinase c receptor (LACK) 8. adenosine kinase 9. aldehyde dehydrogenase, mitochondrial precursor 10. aldose 1-epimerase 11. ATPase beta subunit 12. dihydrolipoamide acetyltransferase precursor 13. fatty acid elongase 14. glutamate dehydrogenase 15. glycosomal malate dehydrogenase 16. glycosomal phosphoenolpyruvate carboxykinase 17. iron superoxide dismutase 18. isocitrate dehydrogenase [NADP], mitochondrial precursor	1. 2,3-bisphosphoglycerate-independent phosphoglycerate mutase 2. 2-oxoisovalerate dehydrogenase alpha subunit 3. 3,2-trans-enoyl-CoA isomerase, mitochondrial precursor 4. 6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating 5. acetyl-CoA synthetase 6. aldose 1-epimerase 7. ATPase beta subunit 8. dihydrolipoamide acetyltransferase precursor 9. fatty acid elongase 10. galactokinase-like protein 11. glutamate dehydrogenase 12. glycosomal malate dehydrogenase 13. glycosomal phosphoenolpyruvate carboxykinase 14. iron superoxide dismutase 15. isocitrate dehydrogenase [NADP], mitochondrial precursor 16. malate dehydrogenase 17. mannose phosphate isomerase 18. MAP kinase 19. mitochondrial associated ribonuclease

	19. malate dehydrogenase 20. mannose phosphate isomerase 21. MAP kinase 22. prostaglandin f2-alpha synthase/D-arabinose dehydrogenase 23. proteasome regulatory ATPase subunit 5 24. P-type H -ATPase 25. Pyridoxal kinase 26. pyruvate dehydrogenase E1 beta subunit 27. pyruvate dehydrogenase E1 component alpha subunit 28. S-adenosylhomocysteine hydrolase 29. S-adenosylmethionine synthetase 30. succinyl-CoA ligase [GDP-forming] beta-chain 31. succinyl-diaminopimelate desuccinylase-like protein 32. transaldolase 33. UDP-glucose pyrophosphorylase	20. N-acyl-L-amino acid amidohydrolase 21. prostaglandin f2-alpha synthase/D-arabinose dehydrogenase 22. P-type H -ATPase 23. pyruvate dehydrogenase E1 beta subunit 24. pyruvate dehydrogenase E1 component alpha subunit 25. S-adenosylhomocysteine hydrolase 26. succinyl-CoA ligase [GDP-forming] beta-chain 27. UDP-glucose pyrophosphorylase 28. vacuolar ATP synthase subunit b
<i>Tradução</i>	1. 40S ribosomal protein S12 2. 40S ribosomal protein S21 3. 40S ribosomal protein S3 4. 40S ribosomal protein S5 5. 40S ribosomal protein S8 6. 40S ribosomal protein SA 7. 60S acidic ribosomal protein P2 8. 60S ribosomal protein L17 9. 60S ribosomal protein L18 10. 60S ribosomal protein L2 11. 60S ribosomal protein L22 12. 60S ribosomal protein L32 13. 60S ribosomal protein L6 14. 60S ribosomal protein L7 15. 60S ribosomal protein L7a	1. 40S ribosomal protein S12 2. 40S ribosomal protein S15 3. 40S ribosomal protein S17 4. 40S ribosomal protein S21 5. 40S ribosomal protein S3 6. 40S ribosomal protein S5 7. 40S ribosomal protein SA 8. 60S acidic ribosomal protein P2 9. 60S ribosomal protein L11 (L5, L16) 10. 60S ribosomal protein L17 11. 60S ribosomal protein L2 12. 60S ribosomal protein L23 13. 60S ribosomal protein L32 14. 60S ribosomal protein L37

	16. 60S ribosomal subunit protein L31 17. arginyl-tRNA synthetase 18. elongation factor 1-alpha 19. elongation factor 2 20. eukaryotic initiation factor 5a 21. eukaryotic translation initiation factor 3 subunit 7-like protein 22. lysyl-tRNA synthetase 23. mitochondrial RNA binding protein 2, MRP2, gBP25 24. polyubiquitin 25. ribosomal protein L1a 26. ribosomal protein L24 27. ribosomal protein S20 28. ribosomal protein S26 29. translation elongation factor 1-beta 30. ubiquitin/ribosomal protein S27a 31. ubiquitin-fusion protein	15. 60S ribosomal protein L6 16. 60S ribosomal protein L7a 17. 60S ribosomal subunit protein L31 18. elongation factor 1-alpha 19. elongation factor 2 20. eukaryotic initiation factor 5a 21. eukaryotic translation initiation factor 3 subunit 22. lysyl-tRNA synthetase 23. mitochondrial RNA binding protein 2, MRP2, gBP25 24. polyubiquitin 25. ribosomal protein S20 26. ribosomal protein S25 27. ribosomal protein S26 28. seryl-tRNA synthetase 29. translation elongation factor 1-beta 30. ubiquitin/ribosomal protein S27a 31. ubiquitin-fusion protein
<i>Resposta a Estresse</i>	1. 2-oxoisovalerate dehydrogenase alpha subunit 2. aldehyde dehydrogenase, mitochondrial precursor 3. d-isomer specific 2-hydroxyacid dehydrogenase- protein 4. glucose-regulated protein 78 5. heat shock protein 6. heat shock protein 83-1 7. iron superoxide dismutase 8. malate dehydrogenase 9. oxidoreductase 10. protein disulfide isomerase 11. pyrroline-5-carboxylate reductase 12. pyruvate dehydrogenase E1 beta subunit	1. 1,2-Dihydroxy-3-keto-5-methylthiopentene dioxygenase 2. 2-oxoisovalerate dehydrogenase alpha subunit 3. d-isomer specific 2-hydroxyacid dehydrogenase- protein 4. glucose-regulated protein 78 5. heat shock protein 6. heat shock protein 83-1 7. iron superoxide dismutase 8. malate dehydrogenase 9. NADH-dependent fumarate reductase protein 10. oxidoreductase 11. peroxidoxin 12. protein disulfide isomerase

	13. pyruvate dehydrogenase E1 component alpha subunit 14. reiske iron-sulfur protein precursor 15. S-adenosylhomocysteine hydrolase 16. trypanothione reductase	13. pyruvate dehydrogenase E1 beta subunit 14. pyruvate dehydrogenase E1 component alpha subunit 15. reiske iron-sulfur protein precursor 16. S-adenosylhomocysteine hydrolase 17. trypanothione reductase 18. tryparedoxin
<i>Biossíntese</i>	1. acetyl-CoA synthetase 2. adenosine kinase 3. dihydroorotate dehydrogenase 4. fatty acid elongase 5. GDP-mannose pyrophosphorylase 6. mannose phosphate isomerase 7. nucleoside diphosphate kinase b 8. phosphomannomutase 9. pyrroline-5-carboxylate reductase 10. S-adenosylmethionine synthetase	1. 1,2-Dihydroxy-3-keto-5-methylthiopentene dioxygenase 2. acetyl-CoA synthetase 3. fatty acid elongase 4. mannose phosphate isomerase 5. nucleoside diphosphate kinase b 6. phosphomannomutase
<i>Enovelamento de Proteína</i>	1. Calreticulin 2. 10 kDa heat shock protein 3. cyclophilin a 4. glucose-regulated protein 78 5. heat shock protein 83-1 6. peptidylprolyl isomerase-like protein 7. T-complex protein 1, theta subunit	1. Calreticulin 2. 10 kDa heat shock protein 3. chaperonin HSP60, mitochondrial precursor 4. glucose-regulated protein 78 5. heat shock protein 70 6. heat shock protein 83-1 7. heat shock protein DNAJ 8. heat shock 70-related protein 1, mitochondrial precursor 9. peptidylprolyl isomerase-like protein 10. T-complex protein 1, theta subunit
<i>Proteólise</i>	1. HsIVU complex proteolytic subunit 2. metallo-peptidase, Clan MA(E), Family 32	1. 20S proteasome subunit alpha 5 2. calpain-like cysteine peptidase, Clan CA, family C2

	3. metallo-peptidase, Clan MA(E), Family M32 4. proteasome alpha 2 subunit 5. proteasome alpha 5 subunit 6. proteasome beta 3 subunit	3. metallo-peptidase, Clan MA(E), Family 32 4. metallo-peptidase, Clan MA(E), Family M32 5. proteasome alpha 1 subunit 6. proteasome alpha 2 subunit 7. proteasome alpha 5 subunit 8. proteasome regulatory non-ATP-ase subunit
<i>Organização do Citoesqueleto</i>	1. kinesin 2. trypanin-like protein	1. ADF/Cofilin 2. cofilin-like protein 3. kinesin 4. trypanin-like protein
<i>Biogênese Ribossomal</i>	1. 40S ribosomal protein SA 2. 60S acidic ribosomal subunit protein	1. 40S ribosomal protein SA 2. 60S acidic ribosomal subunit protein
<i>Transporte</i>	1. ATP synthase F1 subunit gamma protein 2. ATP synthase, epsilon chain 3. ATPase beta subunit 4. glucose transporter, lmg1 5. glucose transporter, lmg2 6. glucose transporter, lmg3 7. GTP binding protein 8. P-type H -ATPase	1. ATP synthase F1 subunit gamma protein 2. ATPase beta subunit 3. glucose transporter, lmg1 4. glucose transporter, lmg2 5. glucose transporter, lmg3 6. GTP binding protein 7. mitochondrial phosphate transporter 8. P-type H -ATPase 9. vacuolar ATP synthase subunit b
<i>Transporte Transmembrana</i>	1. ADP,ATP carrier protein 1, mitochondrial precursor,ADP/ATP translocase 1 2. glucose transporter, lmg1 3. glucose transporter, lmg2 4. glucose transporter, lmg3 5. P-type H -ATPase	1. glucose transporter, lmg1 2. glucose transporter, lmg2 3. glucose transporter, lmg3 4. P-type H -ATPase 5. reiske iron-sulfur protein precursor

	6. reiske iron-sulfur protein precursor	
<i>Transdução de Sinal</i>	1. ADP-ribosylation factor 2. rab7 GTP binding protein	1. ADP-ribosylation factor 2. rab1 small GTP-binding protein 3. rab7 GTP binding protein 4. ras-related rab-4
<i>Processo Metabólico de Ácidos Nucleicos</i>	1. ATP-dependent RNA helicase 2. replication factor A, 51kDa subunit	1. U3 snoRNA-associated protein UTP1
<i>Processo de Modificação de Proteínas</i>	1. cyclophilin a 2. eukaryotic initiation factor 5a 3. MAP kinase 4. peptidylprolyl isomerase-like protein	1. eukaryotic initiation factor 5a 2. MAP kinase 3. NADH-dependent fumarate reductase protein 4. peptidylprolyl isomerase-like protein
<i>Regulação da Expressão Gênica</i>	1. mitochondrial RNA binding protein 2, MRP2, gBP25	1. heat shock protein DNAJ 2. mitochondrial RNA binding protein 2, MRP2, gBP25
<i>Adesão Celular</i>		1. soluble promastigote surface antigen PSA-38S 2. Surface membrane glycoprotein GP46/M-2
<i>Gliconeogênese</i>	1. 2,3-bisphosphoglycerate-independent phosphoglycerate mutase 2. glycosomal phosphoenolpyruvate carboxykinase	1. 2,3-bisphosphoglycerate-independent phosphoglycerate mutase 2. glycosomal phosphoenolpyruvate carboxykinase
<i>Processo Glicolítico</i>	1. 2,3-bisphosphoglycerate-independent phosphoglycerate mutase 2. GDP-mannose pyrophosphorylase	1. 2,3-bisphosphoglycerate-independent phosphoglycerate mutase 2. fructose-1,6-bisphosphate aldolase

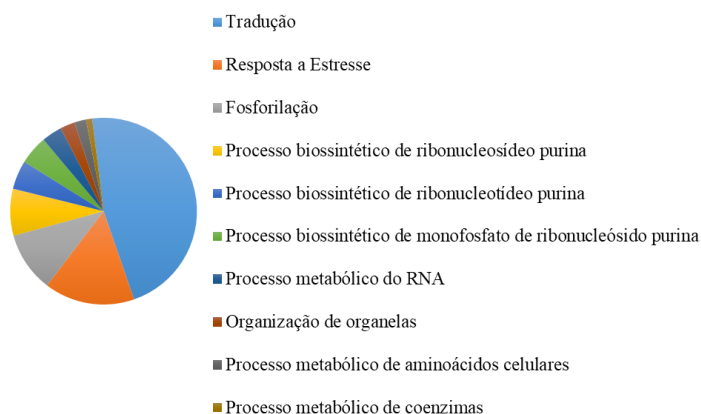
Os processos biológicos foram separados de acordo com a quantificação da abundância das proteínas (abundância diminuída e aumentada), em ambas as cepas

(Figura 21). Podemos observar que a categoria funcional com maior representatividade em *Amastigota Axênica* de BH46, apresentando abundância diminuída foi o processo biológico de Tradução (47%), seguido por Resposta a Estresse (16%) e Fosforilação (10%). Ainda em BH46, apresentando abundância aumentada, os processos biológicos mais representados foram: Fosforilação (17%), seguido por Resposta a Estresse (13%), Transporte de prótons (11%), Processo Catabólico (10%) e Processo metabólico de carboidratos (10%) (Figura 21, A e B).

Em BH400, os processos biológicos mais representados apresentando diminuição de abundância, foram: Tradução (34%), seguido por Resposta a Estresse (18%), Proteólise (16%), Transdução de sinal mediada por GTPase (15%) e Enovelamento de proteínas (14%). Com aumento de abundância, foram observados os processos biológicos de Resposta a Estresse (22%), Enovelamento de proteínas (20%), Transporte transmembrana de íons hidrogênio (19%), Tradução (13%) e Processo metabólico de carboidratos (11%) (Figura 21, B e C).

A)

↓ *Ama. Axênica* BH46



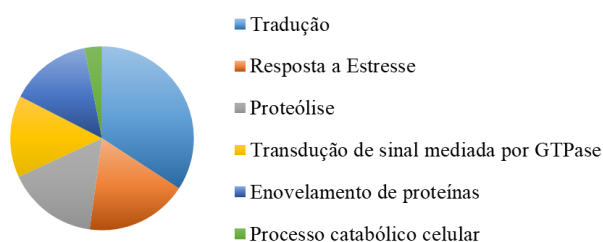
B)

↑ *Ama. Axênica* BH46



C)

↓ *Ama. Axênica* BH400



D)

↑ *Ama. Axênica* BH400

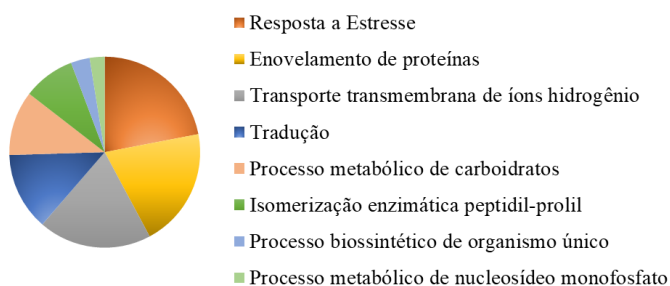


Figura 21: Categorização Funcional das proteínas da forma Amastigota Axênica, diminuídas em BH46 (A), aumentadas em BH46 (B), diminuídas em BH400 (C) e aumentadas em BH400 (D).

Predição de Interação Proteína-Proteína

As possíveis interações entre as proteínas identificadas com diferença de abundância na forma Amastigota Axênica foram preditas através do banco de dados *String 10.0* (*Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins* – www.string-db.org). As redes de interação proteica estão representadas para a cepa BH46 (Figura 22) e para a cepa BH400 (Figura 23). As redes obtidas foram posteriormente editadas no programa *Cytoscape 3.4.0* para a inserção dos valores de fold-change para cada proteína, afim de inserir uma escala colorimétrica de abundância na rede de interação gerada.

Novamente se observa que grande número de proteínas selecionadas e com interações entre si são proteínas ribossomais e reguladoras de tradução, em ambas as cepas. Contudo destaca-se que quase todas elas apresentam diminuição da abundância, exceto 4 proteínas em BH46 e 6 proteínas em BH400 (Figuras 22 e 23). Também destacamos em azul as interações das proteínas pertencentes ao processo biológico de Resposta ao Estresse, de acordo com o Gene Ontology.

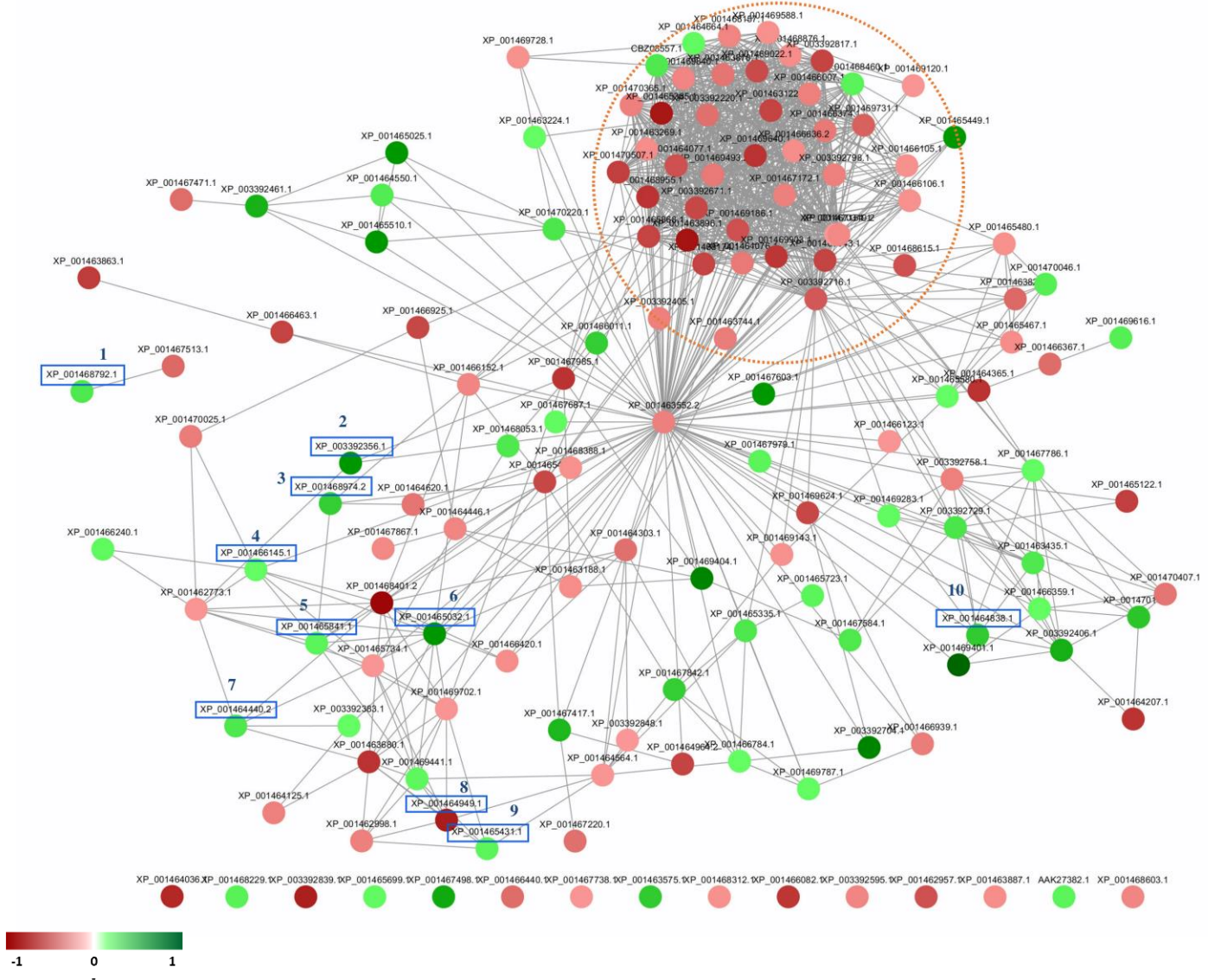


Figura 22: Predição de interação das proteínas identificadas que apresentaram diferença na abundância na forma Amastigota Axênica da cepa BH46. Os valores de abundância relativa estão exibidos na escala colorimétrica usando o log de abundância padronizado, variando de -1 (regulado negativamente; vermelho) para 1 (regulado positivamente; verde). As proteínas destacadas em azul, são proteínas pertencentes ao processo biológico de Resposta ao Estresse, de acordo com o Gene Ontology. São elas: 1- D-isomer 2-hidroxiácido desidrogenase; 2- piroline-5-carboxilato redutase; 3- Proteína precursora de ferro-enxofre Reiske; 4- aldeído desidrogenase; 5- Proteína Conservada Hipotética LinJ.23.1680; 6- glicosomal malato desidrogenase; 7- glutamato desidrogenase; 8- piruvato desidrogenase E1 subunidade alpha; 9- 2-oxoisovalerato desidrogenase subunidade alpha; 10- Proteína Conservada Hipotética LinJ.18.0210. Destacado em laranja observa-se um agrupamento de proteínas ribossomais e reguladoras da tradução que se interagem.

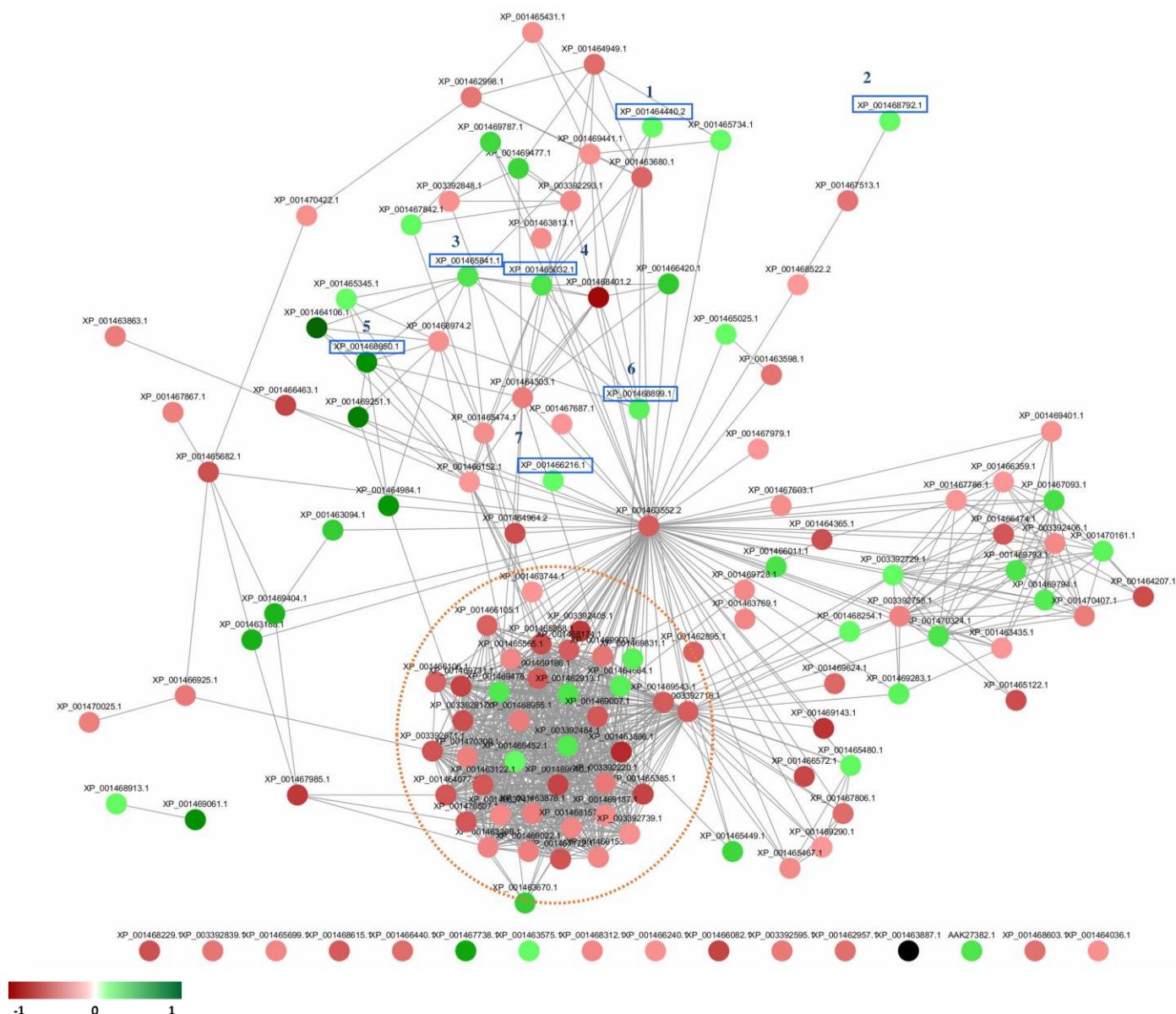


Figura 23: Predição de interação das proteínas identificadas que apresentaram diferença na abundância na forma Amastigota Axênica da cepa BH400. Os valores de abundância relativa estão exibidos na escala colorimétrica usando o log de abundância padronizado, variando de -1 (regulado negativamente; vermelho) para 1 (regulado positivamente; verde). As proteínas destacadas em azul, são proteínas pertencentes ao processo biológico de Resposta ao Estresse, de acordo com o Gene Ontology. São elas: 1- Glutamato Desidrogenase; 2- D-isomero 2-ácido-hidroxí desidrogenase; 3- Proteína Conservada Hipotética LinJ.23.1680; 4- Glicosomal malato desidrogenase; 5- Peptidase mitocondrial, subunidade beta, Metallo-peptidase, Clan ME, Família M16; 6- Fumarato redutase dependente de NADH; 7- Poliprenol redutase. Destacado em laranja observa-se um agrupamento de proteínas ribossomais e reguladoras da tradução que se interagem.

Processos Biológicos Enriquecidos

Após a identificação das proteínas com diferença de abundância entre as cepas na forma Amastigota Axênica, foi realizada uma predição de interação dessas proteínas com o proteoma total do organismo no banco de dados *String-db* (www.string-db.org).

Com o dado gerado pela predição de interação, foi realizado o enriquecimento dos processos biológicos das proteínas encontradas através do pacote BINGO implementado no programa *Cytoscape* 3.4.0, considerando significativo os processos biológicos com valor de P-corrigido menor que 0,05.

Dentre as proteínas diferencialmente expressas de Amastigota Axênica de ambas as cepas, não foi encontrado nenhum processo biológico enriquecido com P-corrigido menor que 0,05.

5.4.3 Amastigotas Esplênicas

O perfil da abundância das proteínas na forma Amastigota Esplênica de ambas as cepas, estão representadas no gráfico de dispersão abaixo (Figura 24).

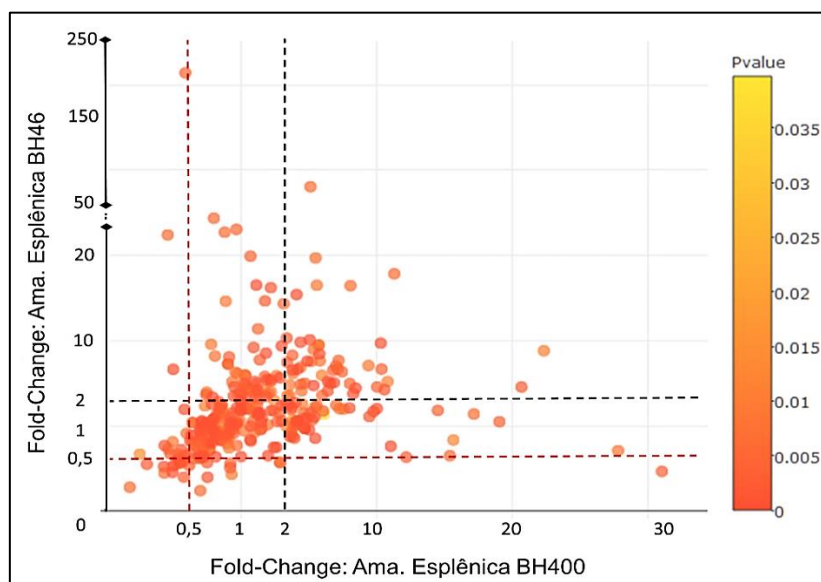


Figura 24: Gráfico de dispersão da abundância global das proteínas identificadas na forma Amastigota Esplênica. Valores de Fold Change $\leq 0,5$ = Abundância Diminuída; Fold Change ≥ 2 = Abundância Aumentada; Fold Change 0,6 ~ 1,9 = Sem Alteração.

No gráfico de dispersão podemos observar uma grande quantidade de proteínas com fold-change superior a 2 na cepa BH400. Entretanto, foram encontradas algumas proteínas com fold-change superior a 30 na cepa BH46. São elas: Malato Desidrogenase, Proteína Conservada Hipotética Tb11.01.3290 e Proteína Conservada Hipotética LinJ.28.1830.

As proteínas encontradas com diferença de abundância na forma Amastigota Esplênica, estão descritas no Apêndice 3, com seus respectivos valores de Fold-Change.

A fim de facilitar a visualização dos dados obtidos, foram construídos Diagramas de Venn comparativos das proteínas com abundância diminuída e aumentada em ambas as cepas na forma Amastigota Esplênica. Podemos observar que em um total de 133 proteínas com abundância diminuída, 58 (43,6%) foram encontradas somente em BH46, 39 (29,3%) em BH400 e 36 (27,1%) são compartilhadas pelas duas cepas. Aquelas que apresentaram aumento de abundância são 148 no total, e estão distribuídas da seguinte forma: 63 (35%), 57 (31,7%) e 60 (33,3%) em BH46, em BH400 e em ambas as cepas, respectivamente (Figura 25).

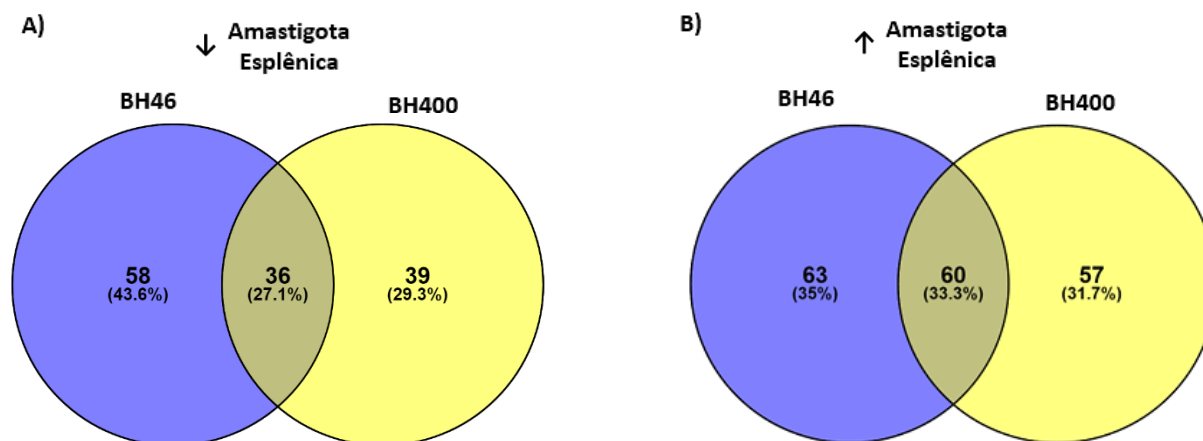


Figura 25: Diagrama de Venn representando o número de proteínas identificadas com (A) abundância diminuída nas cepas e (B) abundância aumentada nas cepas na forma Amastigota Esplênica.

Categorias Funcionais

As proteínas identificadas em nosso estudo foram agrupadas de acordo com os processos biológicos em que participam. A categorização funcional foi realizada de acordo com o consórcio “Gene Ontology”, utilizando a plataforma de bioinformática “Blast2GO Pro” (Tabela 6).

Tabela 6: Categorização funcional das proteínas: As proteínas encontradas com diferença de abundância na forma Amastigota Esplênica das duas cepas, foram categorizadas de acordo com o Processo Biológico nos quais atuam, através do consórcio Gene Ontology - <http://www.geneontology.org/>.

Processos Biológicos	BH46	BH400
<i>Metabolismo</i>	1. 2,3-bisphosphoglycerate-independent phosphoglycerate mutase 2. 2-oxoglutarate dehydrogenase, E2 component, dihydrolipoamide succinyltransferase 3. 3,2-trans-enoyl-CoA isomerase, mitochondrial precursor 4. 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase 5. 3-ketoacyl-CoA thiolase 6. aconitase 7. activated protein kinase c receptor (LACK) 8. adenosine kinase 9. aldose 1-epimerase-like protein 10. ATPase beta subunit 11. dihydrolipoamide acetyltransferase precursor 12. fatty acid elongase	1. 3,2-trans-enoyl-CoA isomerase, mitochondrial precursor 2. 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase 3. 6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating 4. aconitase 5. adenosine kinase 6. ATPase beta subunit 7. citrate synthase 8. fatty acid elongase 9. galactokinase-like protein 10. glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, glycosomal 11. glycosomal malate dehydrogenase 12. glycosomal phosphoenolpyruvate carboxykinase

13. galactokinase-like protein	13. isocitrate dehydrogenase [NADP], mitochondrial precursorated protein-like protein
14. glutamate dehydrogenase	14. malate dehydrogenase
15. glycosomal malate dehydrogenase	15. MAP kinase
16. glycosomal phosphoenolpyruvate carboxykinase	16. mitochondrial malate dehydrogenase
17. hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase	17. prostaglandin f2-alpha synthase/D-arabinose dehydrogenase
18. iron superoxide dismutase	18. pyruvate dehydrogenase E1 beta subunit
19. isocitrate dehydrogenase [NADP], mitochondrial precursorated protein-like protein	19. pyruvate dehydrogenase E1 component alpha subunit
20. malate dehydrogenase	20. pyruvate phosphate dikinase
21. mannose phosphate isomerase	21. transaldolase
22. mitochondrial associated ribonuclease	22. UDP-glucose pyrophosphorylase
23. mitochondrial malate dehydrogenase	23. vacuolar ATP synthase subunit b
24. N-acyl-L-amino acid amidohydrolase	
25. prostaglandin f2-alpha synthase/D-arabinose dehydrogenase	
26. proteasome regulatory ATPase subunit 5	
27. P-type H -ATPase	
28. Pyridoxal kinase	
29. pyruvate dehydrogenase E1 beta subunit	
30. pyruvate phosphate dikinase	
31. S-adenosylhomocysteine hydrolase	
32. S-adenosylmethionine synthetase	
33. succinyl-CoA ligase [GDP-forming] beta-chain	
34. succinyl-coA:3-ketoacid-coenzyme A transferase, mitochondrial precursor	
35. succinyl-diaminopimelate desuccinylase-like protein	
36. transaldolase	
37. UDP-glucose pyrophosphorylase	
38. vacuolar ATP synthase subunit b	

Tradução

1. 40S ribosomal protein S12	1. 40S ribosomal protein S15
2. 40S ribosomal protein S13	2. 40S ribosomal protein S16
3. 40S ribosomal protein S15	3. 40S ribosomal protein S17
4. 40S ribosomal protein S21	4. 40S ribosomal protein S21
5. 40S ribosomal protein S23	5. 40S ribosomal protein S24e
6. 40S ribosomal protein S24e	6. 40S ribosomal protein S3
7. 40S ribosomal protein S3A	7. 40S ribosomal protein S4
8. 40S ribosomal protein S5	8. 40S ribosomal protein S8
9. 40S ribosomal protein SA	9. 40S ribosomal protein AS
10. 60S acidic ribosomal protein P2	10. 60S ribosomal protein L11 (L5, L16)
11. 60S ribosomal protein L13	11. 60S ribosomal protein L13a
12. 60S ribosomal protein L13a	12. 60S ribosomal protein L17
13. 60S ribosomal protein L17	13. 60S ribosomal protein L18a
14. 60S ribosomal protein L2	14. 60S ribosomal protein L2
15. 60S ribosomal protein L22	15. 60S ribosomal protein L21
16. 60S ribosomal protein L28	16. 60S ribosomal protein L23a
17. 60S ribosomal protein L32	17. 60S ribosomal protein L28
18. 60S ribosomal protein L34	18. 60S ribosomal protein L34
19. 60S ribosomal protein L35	19. 60S ribosomal protein L37
20. 60S ribosomal protein L37	20. 60S ribosomal protein L6
21. 60S ribosomal protein L7	21. 60S ribosomal protein L9
22. 60S ribosomal protein L7a	22. 60S ribosomal subunit protein L31
23. 60S ribosomal subunit protein L31	23. elongation factor 1-alpha
24. elongation factor 1-alpha	24. elongation factor 2
25. elongation factor 2	25. eukaryotic initiation factor 5a
26. eukaryotic translation initiation factor 3 subunit	26. eukaryotic translation initiation factor 3 subunit
27. lysyl-tRNA synthetase	27. eukaryotic translation initiation factor 3 subunit 7-like protein
28. mitochondrial RNA binding protein 1, MRP1, gBP21	28. lysyl-tRNA synthetase
29. ribosomal protein L1a	29. mitochondrial RNA binding protein 1, MRP1, gBP21
30. ribosomal protein L24	30. polyubiquitin
31. ribosomal protein S25	31. ribosomal protein L1a
32. ribosomal protein S26	32. ribosomal protein S20
33. translation elongation factor 1-beta	

		33. ribosomal protein S25 34. ribosomal protein S26 35. ribosomal protein S6,NPH2/RS6-like protein 36. seryl-tRNA synthetase 37. translation elongation factor 1-beta 38. ubiquitin/ribosomal protein S27a 39. ubiquitin-fusion protein
<i>Resposta a Estresse</i>	1. 1,2-Dihydroxy-3-keto-5-methylthiopentene dioxygenase 2. 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase 3. cytochrome c 4. dihydrolipoamide dehydrogenase 5. glucose-regulated protein 78 6. heat shock protein 7. heat shock protein 83-1 8. heat shock protein DNAJ 9. iron superoxide dismutase 10. malate dehydrogenase 11. mitochondrial malate dehydrogenase 12. NADH-dependent fumarate reductase protein 13. oxidoreductase 14. protein disulfide isomerase 15. pyrroline-5-carboxylate reductase 16. pyruvate dehydrogenase E1 beta subunit 17. reiske iron-sulfur protein precursor 18. ribonucleoprotein p18, mitochondrial precursor 19. S-adenosylhomocysteine hydrolase 20. stress-inducible protein STI1 homolog 21. tryparedoxin 22. tryparedoxin peroxidase	1. 1,2-Dihydroxy-3-keto-5-methylthiopentene dioxygenase 2. 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase 3. cytochrome c 4. dihydrolipoamide dehydrogenase 5. d-isomer specific 2-hydroxyacid dehydrogenase- protein 6. glutathione peroxidase-like protein 7. heat shock protein 8. heat shock protein 83-1 9. malate dehydrogenase 10. mitochondrial malate dehydrogenase 11. oxidoreductase 12. peroxidoxin 13. protein disulfide isomerase 14. pyruvate dehydrogenase E1 component alpha subunit 15. stress-inducible protein STI1 homolog 16. thiol-dependent reductase 1 17. trypanothione reductase 18. tryparedoxin 19. tryparedoxin peroxidase

<i>Biossíntese</i>	1,2-Dihydroxy-3-keto-5-methylthiopentene dioxygenase 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase - adenosine kinase - dihydroorotate dehydrogenase - fatty acid elongase - mannose phosphate isomerase - nucleoside diphosphate kinase b - pyrroline-5-carboxylate reductase - S-adenosylmethionine synthetase	1,2-Dihydroxy-3-keto-5-methylthiopentene dioxygenase 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase - adenosine kinase - fatty acid elongase - GDP-mannose pyrophosphorylase - nucleoside diphosphate kinase b - phosphomannomutase
<i>Enovelamento de Proteína</i>	- chaperonin HSP60, mitochondrial precursor - cyclophilin a - glucose-regulated protein 78 - heat shock protein 70-related protein - heat shock protein - heat shock protein 83-1 - heat shock protein DNAJ - peptidylprolyl isomerase-like protein - T-complex protein 1, theta subunit	- Calreticulin - chaperonin HSP60, mitochondrial precursor - cyclophilin a - heat shock protein 70-related protein - heat shock protein 83-1 - peptidylprolyl isomerase-like protein
<i>Proteólise</i>	20S proteasome subunit alpha 5 - cytoskeleton-associated protein CAP5.5, cysteine peptidase, Clan CA, family C2 - Hs1VU complex proteolytic subunit - metallo-peptidase, Clan MA(E), Family 32 - metallo-peptidase, Clan MA(E), Family M32 - proteasome beta 3 subunit	20S proteasome subunit alpha 5 - calpain-like cysteine peptidase, Clan CA, family C2 - metallo-peptidase, Clan MA(E), Family 32 - proteasome alpha 1 subunit - proteasome alpha 2 subunit - proteasome alpha 3 subunit - proteasome alpha 5 subunit - proteasome regulatory non-ATP-ase subunit
<i>Organização do Citoesqueleto</i>	- Kinesin - trypanin-like protein	- cofilin-like protein - kinesin - kinesin K39 - trypanin-like protein

<i>Biogênese Ribossomal</i>	1. 40S ribosomal protein AS 2. 60S acidic ribosomal subunit protein	1. 40S ribosomal protein SA
<i>Transporte</i>	1. ATP synthase F1 subunit gamma protein 2. ATP synthase, epsilon chain 3. ATPase beta subunit 4. GTP binding protein 5. P-type H -ATPase 6. vacuolar ATP synthase subunit b	1. ATP synthase F1 subunit gamma protein 2. ATP synthase, epsilon chain 3. ATPase beta subunit 4. glucose transporter, lmg1 5. glucose transporter, lmg2 6. glucose transporter, lmg3 7. GTP binding protein 8. mitochondrial phosphate transporter 9. vacuolar ATP synthase subunit b
<i>Transporte Transmembrana</i>	1. P-type H –ATPase 2. reiske iron-sulfur protein precursor	1. ADP,ATP carrier protein 1, mitochondrial precursor,ADP/ATP translocase 1 2. glucose transporter, lmg1 3. glucose transporter, lmg2 4. glucose transporter, lmg3
<i>Transdução de Sinal</i>	1. ADP-ribosylation factor 2. rab1 small GTP-binding protein 3. rab7 GTP binding protein 4. ras-related rab-4	1. rab1 small GTP-binding protein 2. rab7 GTP binding protein 3. ras-related rab-4
<i>Processo Metabólico de Ácidos Nucleicos</i>	1. ATP-dependent RNA helicase 2. orotidine-5-phosphate decarboxylase/orotate phosphoribosyltransferase,OMPDCase-OPRTase 3. replication factor A, 51kDa subunit 4. U3 small nucleolar ribonucleoprotein protein MPP10 5. U3 snoRNA-associated protein UTP11	1. U3 snoRNA-associated protein UTP11
<i>Processo de Modificação de Proteínas</i>	1. biotin/lipoate protein ligase-like protein 2. cyclophilin a 3. NADH-dependent fumarate reductase protein	1. cyclophilin a 2. eukaryotic initiation factor 5a 3. MAP kinase

	4. peptidylprolyl isomerase-like protein	4. peptidylprolyl isomerase-like protein
<i>Organização de Componentes Celulares</i>		1. glycosomal membrane protein
<i>Regulação da Expressão Gênica</i>	1. heat shock protein DNAJ 2. mitochondrial RNA binding protein 1, MRP1, gBP21	1. mitochondrial RNA binding protein 1, MRP1, gBP21
<i>Adesão Celular</i>		1. soluble promastigote surface antigen PSA-38S 2. Surface membrane glycoprotein GP46/M-2
<i>Gliconeogênese</i>	1. 2,3-bisphosphoglycerate-independent phosphoglycerate mutase 2. glycosomal phosphoenolpyruvate carboxykinase 3. triosephosphate isomerase	1. glycosomal phosphoenolpyruvate carboxykinase
<i>Processo Glicolítico</i>	1. 2,3-bisphosphoglycerate-independent phosphoglycerate mutase 2. fructose-1,6-bisphosphate aldolase 3. triosephosphate isomerase	1. GDP-mannose pyrophosphorylase 2. glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, glycosomal

Os processos biológicos foram separados de acordo com a quantificação da abundância das proteínas (abundância diminuída e aumentada), em ambas as cepas (Figura 26). Podemos observar que a categoria funcional com maior representatividade em *Amastigota Esplênica* da cepa BH46 com abundância diminuída foi o processo biológico de Resposta a Estresse (16%), seguido por Biogênese de ribossomo (13%) e Tradução (13%), Processo catabólico de proteínas (12%), Processo metabólico de carboidratos (11%), Fosforilação (10%) e Enovelamento de proteínas (10%). Com abundância aumentada na cepa BH46, os processos biológicos mais representados foram: Resposta a Estresse (23%) e Tradução (23%), seguidos por Proteólise (22%) e Processo biossintético de organismo único (10%) (Figura 26, A e B).

Na cepa BH400, o processo biológico com maior representatividade, apresentando diminuição da abundância foi a Resposta a Estresse (15%) e Processo

catabólico de proteína dependente de ubiquitina (15%), seguidos por Regulação da tradução (10%) e Processo biossintético de GDP-manose (10%). Todos os outros processos biológicos foram representados com 5% cada. Com abundância aumentada, os processos biológicos mais representados em BH400 foram: Tradução (27%), seguido por Resposta a Estresse (25%), Transporte Transmembrana (15%) e Processo metabólico de compostos contendo fosfato (8%) (Figura 26, C e D).

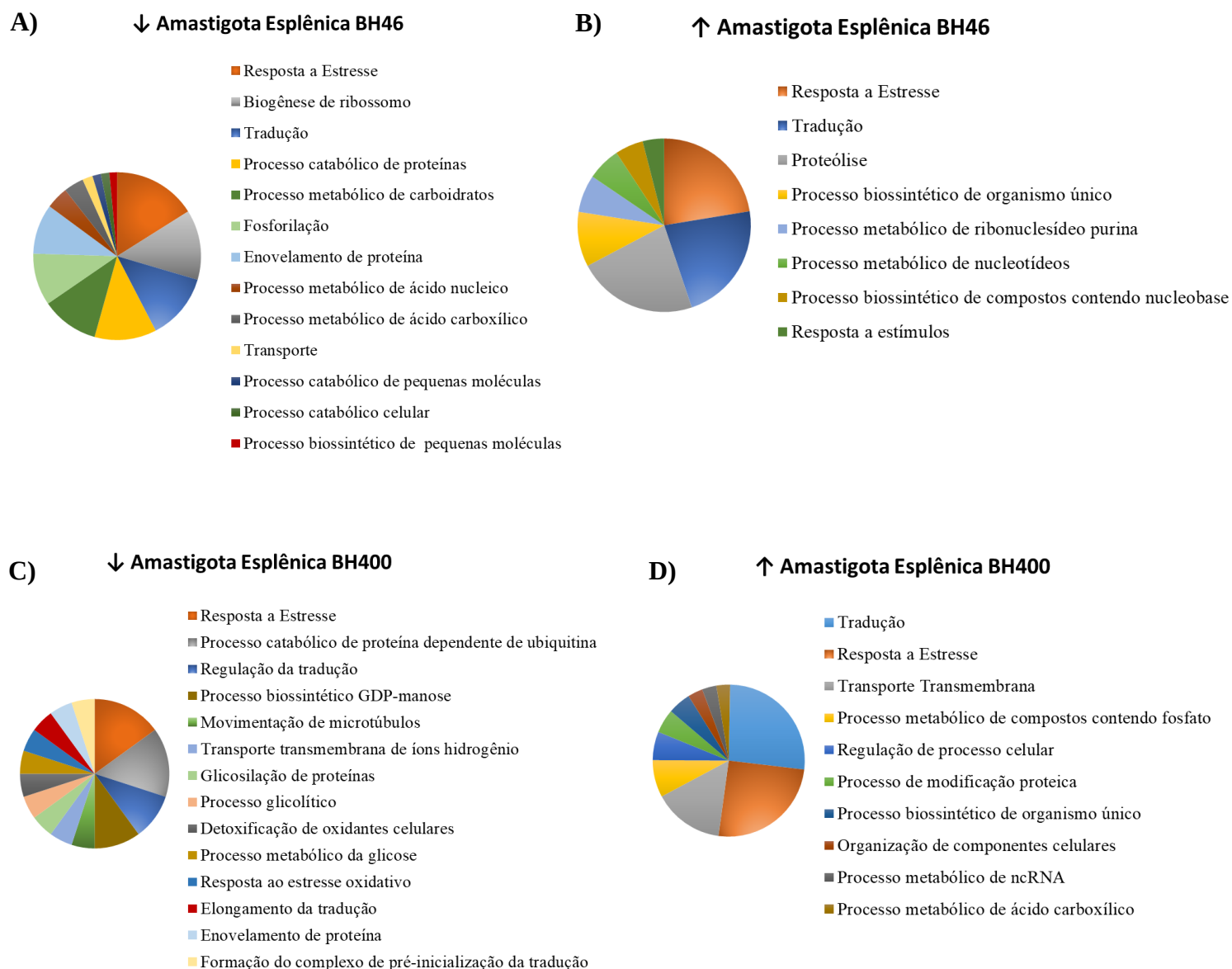


Figura 26: Categorização Funcional das proteínas da forma Amastigota Esplênica, diminuídas em BH46 (A), aumentadas em BH46 (B), diminuídas em BH400 (C) e aumentadas em BH400 (D).

Novamente, podemos observar que a categoria funcional com maior representatividade em ambas as cepas é a de Tradução, com 56% e 58% do total de proteínas identificadas em BH46 e BH400, respectivamente. Em seguida a categoria de proteínas envolvidas com Resposta a Estresse foi responsável por agrupar 24% das proteínas de BH46 e 20% em BH400. Podemos também verificar que o Processo Metabólico de Compostos Fosfato é a terceira maior na cepa BH46, representado por 8% das proteínas. Em BH400, o terceiro maior Processo Biológico representado é o Processo Metabólico do Ácido Carboxílico, com 5%.

Predição de Interação Proteína-Proteína

Utilizando banco de dados *String 10.0* (*Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins* – www.string-db.org), foram realizadas predições de interações das proteínas diferencialmente expressas (aumentadas e diminuídas) na forma Amastigota Esplênica de ambas as cepas (Figuras 27 e 28). Essas redes foram posteriormente editadas no programa *Cytoscape 3.4.0* para a inserção dos valores de fold-change para cada proteína, afim de inserir uma escala colorimétrica de abundância na rede de interação predita. Observa-se nas redes de interações que as proteínas pertencentes ao processo biológico de Resposta ao Estresse, de acordo com o Gene Ontology, foram destacadas em azul e é possível observar que várias delas se relacionam.

O agrupamento de proteínas ribossomais e reguladoras da tradução que foram vistas nas redes de interações de Amastigota Axênica e de Promastigotas, também foram observadas com uma forte interação em Amastigota Esplênica em ambas as cepas. Entretanto, diferentemente das formas evolutivas anteriores, se observa um aumento de abundância de grande parte das proteínas pertencentes a esse processo, sendo ainda maior na cepa BH400.

Ainda em BH400, se observa outro agrupamento, representado por proteínas que participam da via metabólica com várias proteínas apresentando um aumento de abundância, destacado como número 1 em laranja, na Figura 28.

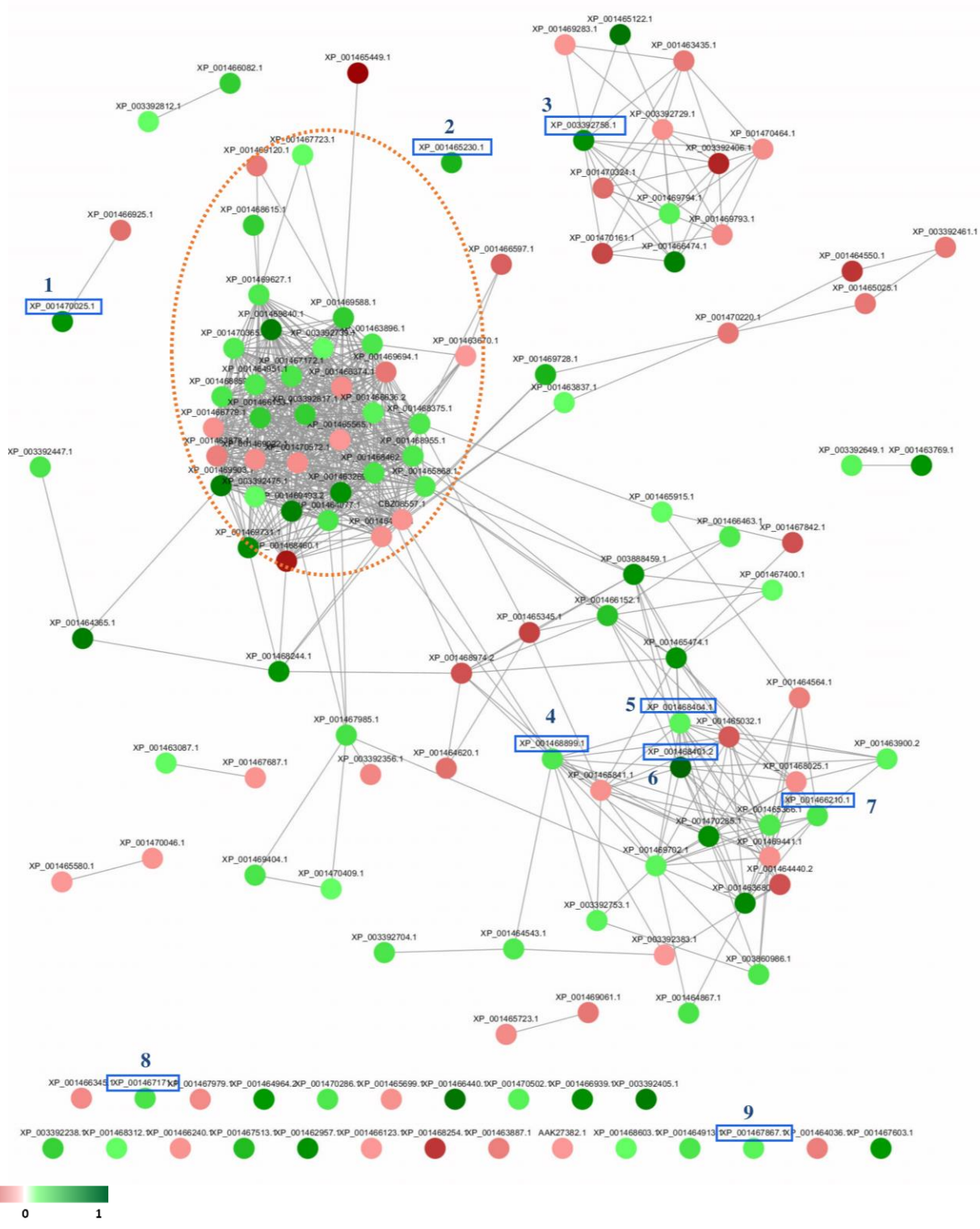


Figura 27: Predição de interação das proteínas identificadas que apresentaram diferença na abundância na forma Amastigota Esplênica da cepa BH46. Os valores de abundância relativa estão exibidos na escala colorimétrica usando o log de abundância padronizado, variando de -1 (regulado negativamente; vermelho) para 1 (regulado positivamente; verde). As proteínas destacadas em azul, são proteínas pertencentes ao processo biológico de Resposta ao Estresse,

de acordo com o Gene Ontology. São elas: 1- oxidoreductase; 2- 1,2-Dihidroxi-3-keto-5-metiltiopenteno dioxigenase; 3- Proteína de Choque Térmico; 4- Fumarato redutase dependente de NADH; 5- Malato Desidrogenase mitocondrial; 6- Malato Desidrogenase; 7- Piruvato desidrogenase E1 subunidade beta; 8- 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA redutase; 9- Superóxido Dismutase de Ferro. Destacado em laranja observa-se um agrupamento de proteínas ribossomais e reguladoras da tradução que se interagem.

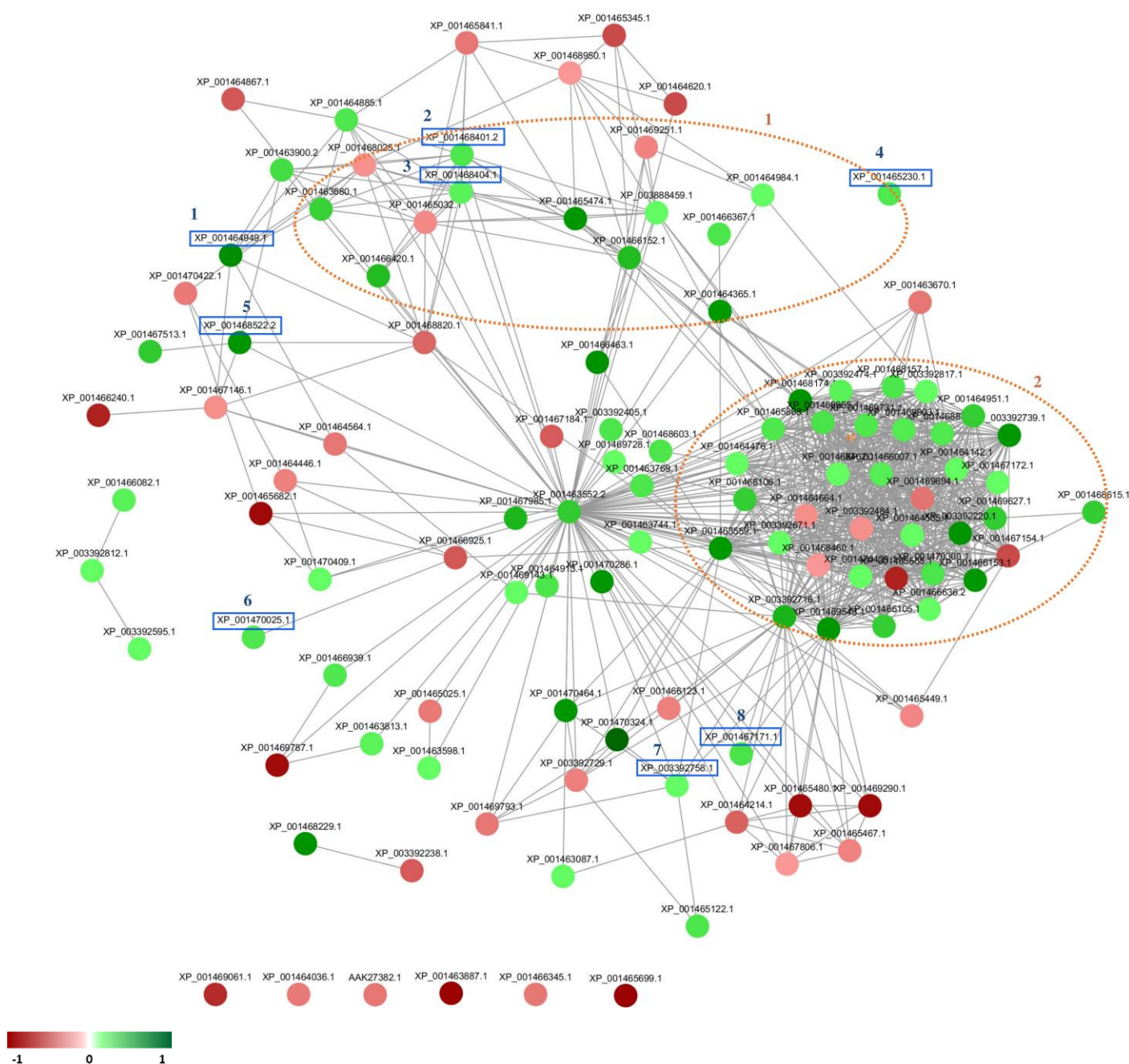


Figura 28: Predição de interação das proteínas identificadas que apresentaram diferença na abundância na forma Amastigota Eplênica da cepa BH400. Os valores de abundância

relativa estão exibidos na escala colorimétrica usando o log de abundância padronizado, variando de -1 (regulado negativamente; vermelho) para 1 (regulado positivamente; verde). As proteínas destacadas em azul, são proteínas pertencentes ao processo biológico de Resposta ao Estresse, de acordo com o Gene Ontology. São elas: 1- Piruvato desidrogenase E1 subunidade alpha; 2- Malato Desidrogenase; 3- Mitocondrial Malato Desidrogenase; 4- 1,2-Dihidroxi-3-keto-5-metiltiopenteno dioxigenase; 5- D-isomero 2-ácido-hidroxi desidrogenase; 6- Oxidoredutase; 7- Proteína de Choque Térmico; 8- 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA redutase. Destacados em laranja: 1- Interações de Proteínas relacionadas com a via metabólica; 2- Agrupamento de proteínas ribossomais e reguladoras da tradução que se interagem.

Processos Biológicos Enriquecidos

A partir da rede predita de interações, foi analisado a presença de processos biológicos enriquecidos nas proteínas encontradas através do pacote BINGO, implementado no programa *Cytoscape* 3.4.0 e foram considerados significativos os processos biológicos com valor de P-corrigido menor que 0,05 (Figura 29).

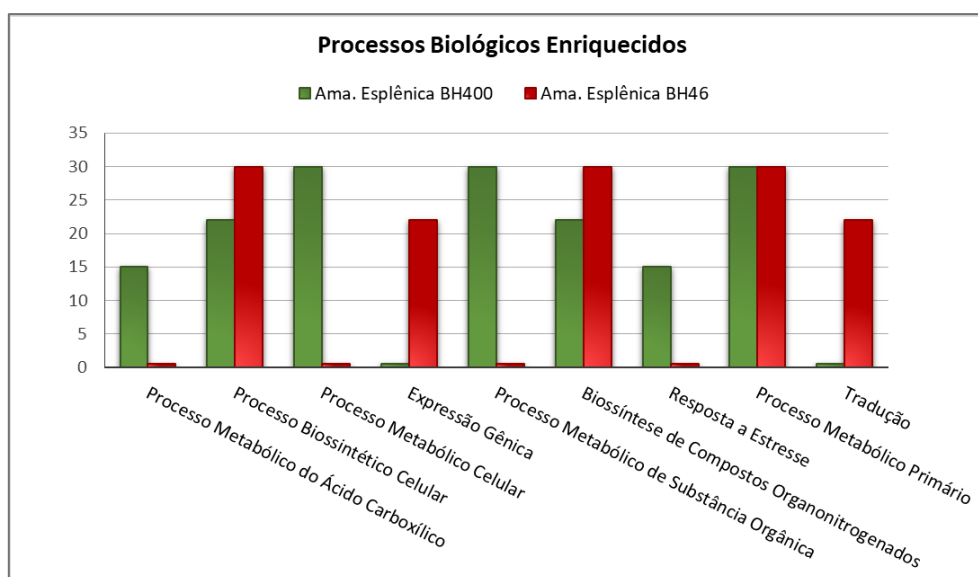


Figura 29: Processos Biológicos Enriquecidos das proteínas diferencialmente expressas na forma Amastigota Esplênica.

Os processos biológicos enriquecidos mais representados foram: Processo Metabólico de Ácido Carboxílico; Processo Metabólico Celular; Processo Metabólico de Substância Orgânica e Resposta ao Estresse. Contudo, diferente da forma promastigota citada anteriormente, observou-se uma maior quantidade de processos biológicos enriquecidos em Amastigota Esplênica da cepa BH46 quando comparado com a cepa BH400. Esses processos biológicos enriquecidos foram: Processo de Biossíntese Celular; Expressão Gênica; Processo de Biossíntese de Compostos Organo-Nitrogenados e Tradução.

5.5 Análise Comparativa entre as Formas Evolutivas

Em busca de candidatas a fatores de virulência, foram destacadas aquelas proteínas com diferença de abundância (aumentadas e diminuídas) na cepa mais virulenta (BH400).

Dentre as 158 proteínas com aumento de abundância em BH400, 5 foram encontradas em Promastigota e Amastigota Axênica simultaneamente: Proteína Conservada Hipotética LinJ.34.3590, Citocromo C Oxidase Subunidade IV, Galactokinase-like, Pequena Proteína de Ligação-GTP Rab1 e Vacuolar ATP Sintase subunidade b; 8 proteínas estão na interseção entre Promastigota e Amastigota Esplênica: Calpaína-Like Cisteína Peptidase, Proteína Conservada Hipotética LinJ.36.7070, Transportador de Glicose Lmgt1, 2 e 3, Proteína Ribossomal 60S L6, Proteína Ribossomal S20 e Fator 5a de Iniciação em Eucariotos; e apenas 1 proteína foi encontrada compartilhada entre Amastigota Axênica e Esplênica: Proteína Carreadora de ADP, ATP 1 (Figura 30).

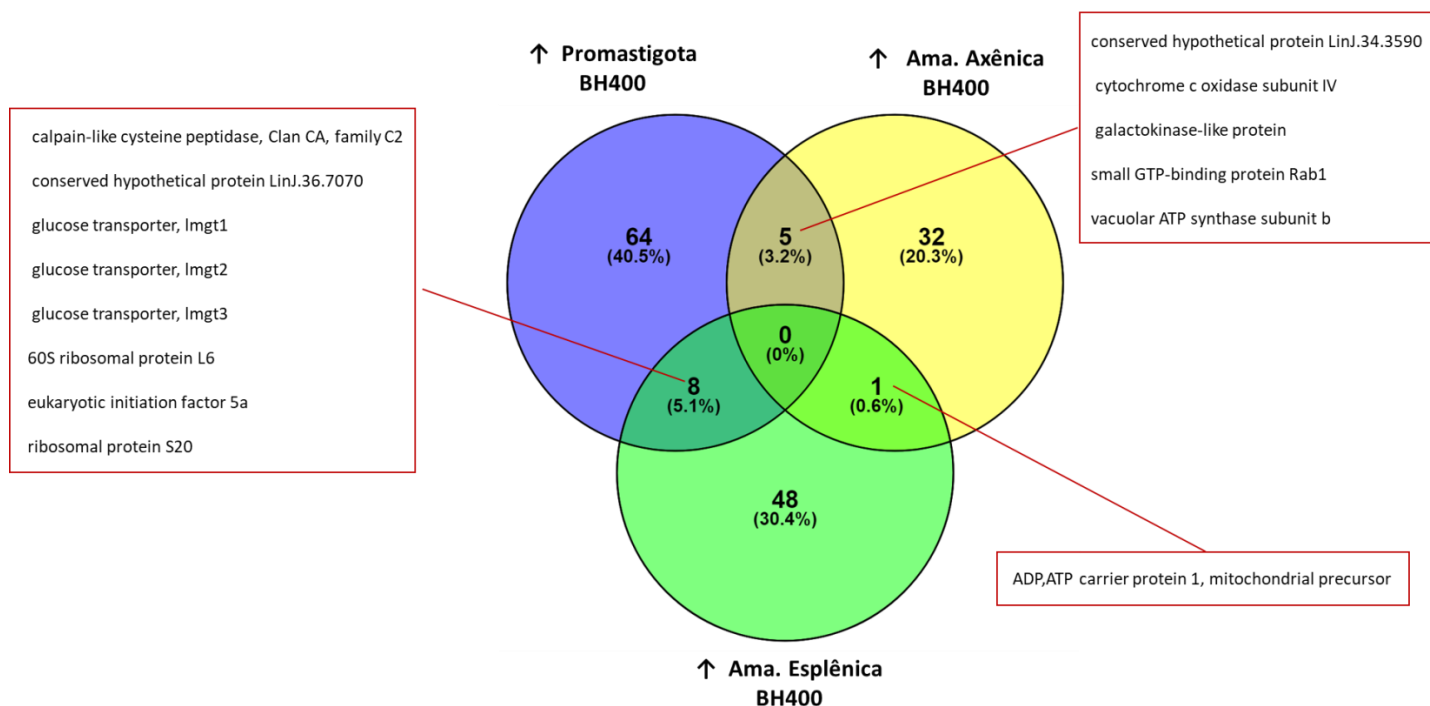


Figura 30: Diagrama de Venn das proteínas com abundância aumentada na cepa BH400 nas três formas evolutivas. As proteínas presentes em pelo menos duas formas evolutivas (interseções) estão demonstradas nos quadros. As proteínas encontradas especificamente em cada forma evolutiva estão descritas no Apêndice 2.

Em relação ao total de 140 proteínas com abundância diminuída em BH400, 6 delas foram encontradas compartilhadas entre Promastigota e em Amastigota Axênica: 1,2-Dihidroxi-3-keto-5-metilthiopenteno dioxigenase, Proteína Conservada Hipotética Lbrm.34.0220, Proteína Conservada Hipotética Tb10.70.1640, Proteína do Choque Térmico HSP70, Ribonuclease Associada a Mitocôndria e Proteína U3 sno-RNA associada a UTP11; 2 proteínas encontradas em comum entre Promastigota e Amastigota Esplênica: GDP-Manose Pirofosforilase e Kinesina K39; e 12 proteínas encontradas em comum entre Amastigota Axênica e Amastigota Esplênica: ADF/Cofilina, Fator de Iniciação da Tradução em Eucariotos Subunidade 3, Glutathione Peroxidase-like, Peroxidoxina, Subunidade alpha 1 do Proteasoma, Piruvato Kinase, Antígeno Solúvel de Superfície de Promastigota PSA-38S, Proteína Conservada Hipotética LinJ.25.0160, LinJ.32.2330 e LinJ.30.1140, Subunidade Reguladora do Proteasoma não-ATPase e Glicoproteína de Superfície de Membrana GP64/M-2 (Figura 31).

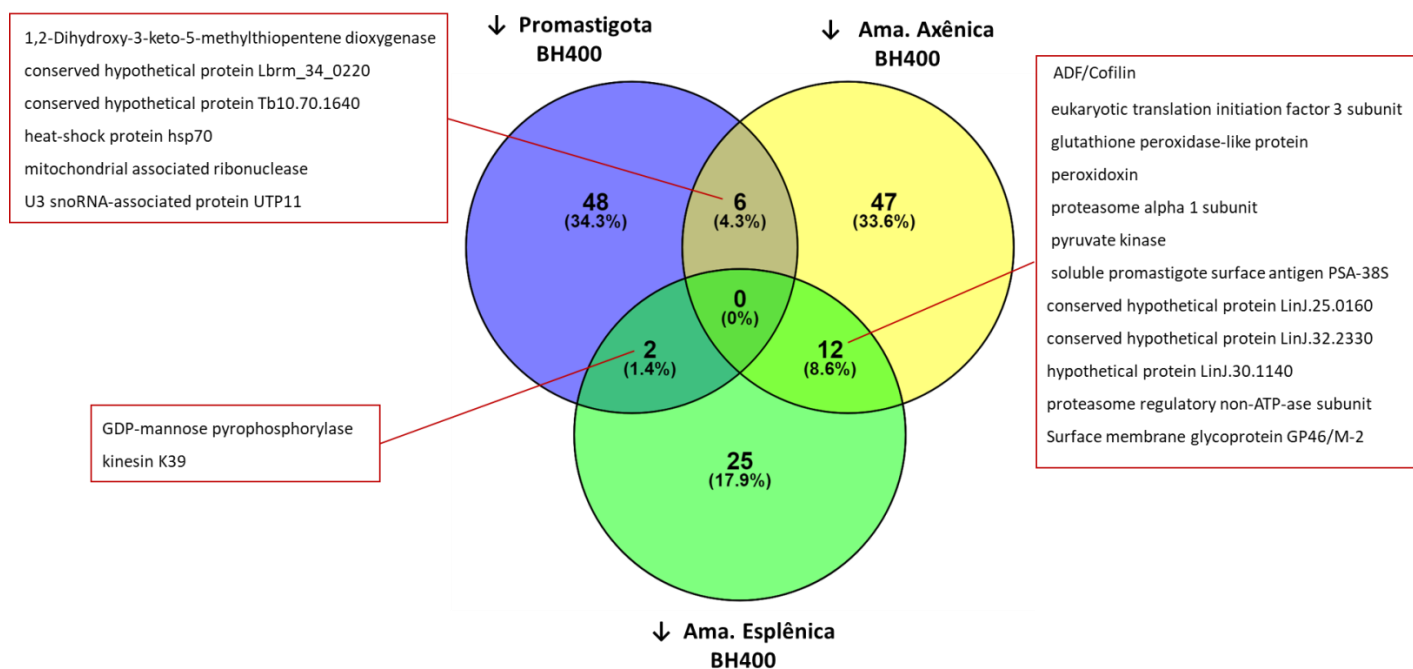


Figura 31: Diagrama de Venn das proteínas com abundância diminuída na cepa BH400 nas três formas evolutivas. As proteínas presentes em pelo menos duas formas evolutivas (interseções) estão demonstradas nos quadros. As proteínas encontradas especificamente em cada forma evolutiva estão descritas no Apêndice 3.

Para observar o perfil de abundância de todas as proteínas identificadas de uma maneira mais ampla, foi confeccionado uma representação gráfica colorimétrica dos dados, onde as linhas representam as proteínas e as colunas representam as formas evolutivas em ambas as cepas (Figura 32).

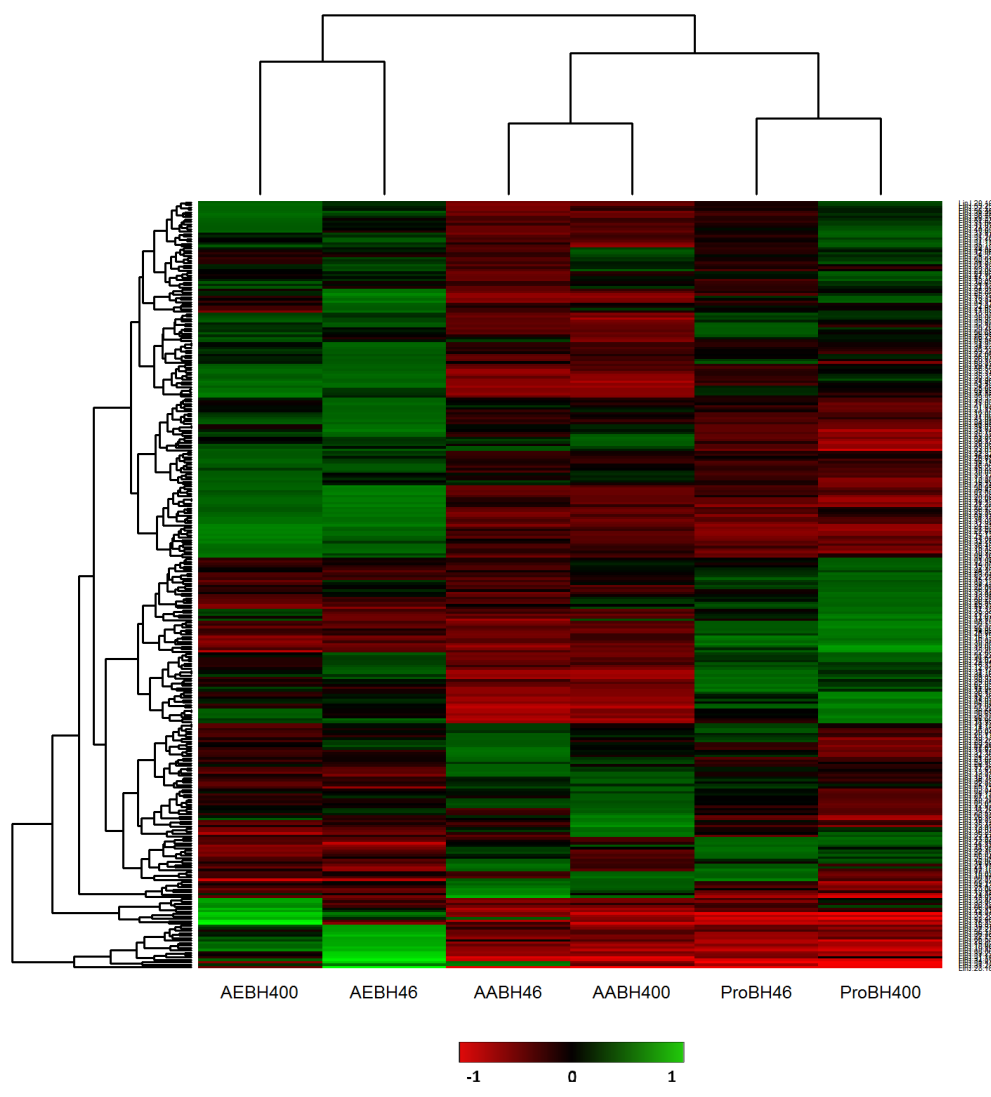


Figura 32: Representação colorimétrica dos valores de abundância das proteínas identificadas com diferenças de expressão entre as amostras. Os valores de abundância estão exibidos na escala colorimétrica usando o log de abundância padronizado, variando de -1 (regulado-negativamente; vermelho) para 1 (regulado-positivamente; verde). Pro = Promastigota; AA = Amastigota Axênica; AE = Amastigota Esplênica.

Observa-se pelo dendograma superior do *heatmap* e pela escala colorimétrica representada, uma maior semelhança entre a abundância das proteínas em Promastigota e Amastigota Axênica do que em Amastigota Esplênica, independente da cepa. Além disso, é possível observar ligeiramente uma quantidade maior de proteínas com aumento de abundância (em verde) em Amastigota Esplênica e em Promastigota da cepa BH400, quando comparadas com a cepa BH46. Em contrapartida, há uma grande quantidade de proteínas com abundância diminuída em Amastigotas Axênicas de ambas as cepas.

6 DISCUSSÃO

Neste estudo, foi realizada uma análise proteômica comparativa entre duas cepas de *L. infantum* que exibem diferença de virulência. Em estudos prévios, mostramos que a cepa BH400 apresentou caráter mais virulento quando comparada a cepa BH46. Também identificamos através de 2D DIGE, proteínas que podem estar associadas a virulência quando comparamos as formas promastigotas do parasito (Pires et al., 2014). Foram esses resultados que nos encorajaram a buscar por mais proteínas que pudessem estar associadas à diferença do fenótipo virulência exibido pelas cepas em questão. Assim, no presente estudo, utilizamos duas técnicas de proteoma quantitativo, DIGE e TMT, para realizar o estudo comparativo entre as formas promastigotas, amastigotas axênica e esplênicas nas cepas de maior e menor virulência.

As formas amastigotas tornam-se alvo importante na investigação por fatores de virulência uma vez que são responsáveis pelo desenvolvimento e propagação da doença, e também são intracelulares, mantendo contato direto com células e com as moléculas do hospedeiro. A maioria dos trabalhos que utilizaram a forma amastigota do parasito, a obtiveram através de alterações do pH do meio e temperatura de cultivo, são denominadas de amastigotas axênicas. Acreditamos que devido ao fato de essas formas axênicas não sofrerem pressão seletiva, já que não entram em contato com o sistema imune e nem com moléculas do organismo hospedeiro, não representam de maneira fidedigna as formas amastigotas. Assim, em nosso estudo foi incluída uma análise comparativa entre as formas promastigota, amastigota axênica e amastigota esplênica das cepas com maior virulência (BH400) e menos virulenta (BH46).

As amastigotas esplênicas utilizadas em nosso estudo foram obtidas a partir da infecção experimental de Hamster (*Mesocricetus auratus*). O modelo de estudo ideal para Leishmaniose Visceral (LV), a fim de melhor reproduzir a doença é a utilização de cães infectados com o agente etiológico *L. infantum*. Porém, esse modelo apresenta algumas dificuldades, tais como custo, manutenção, necessidade de maior espaço físico e do uso de grande número de animais (Riça-Capela *et al*, 2003). Como alternativa, o Hamster é amplamente utilizado, uma vez que são susceptíveis a infecções por diferentes espécies de *Leishmania*, especialmente no estudo da LV desde 1960 (Ott et al, 1967; Gifawesen e Farrel, 1989). Assim como na LV humana, a doença em hamsters provocada por cepas viscerotrópicas é caracterizada por evolução progressiva, exibindo sinais clínicos e sintomas como astenia, anemia, hepato-esplenomegalia, hipergamaglobulinemia,

desidratação e podendo culminar em morte (Farrel et al, 1976; Rodrigues et al, 1992). Tudo isso faz com que o uso de hamsters como modelo experimental para infecções com *L. infantum* seja amplamente aceito e utilizado, já que que o curso da infecção nesse modelo mimetiza a doença em cães e no homem (Riça-Capela et al, 2003).

Em nosso trabalho, os géis bidimensionais de Promastigota, Amastigota Axênica e Amastigota Esplênica de *L. infantum* apresentaram uma média de 1000 *spots*/gel, quantidade considerada satisfatória quando comparado com trabalhos semelhantes como Walker et al, 2006; Cuervo et al, 2007; Paape et al, 2008 e Mojtahedi et al, 2008 que detectaram uma média de 660, 650, 391 e 600 *spots*/gel, respectivamente. Além disso, obtivemos índices de Correlação entre os géis que variam de 0,82 a 0,96, indicando uma boa reprodutibilidade nos nossos experimentos, já que valores próximos a 1,00 indicam uma boa correlação entre as posições relativas dos *spots* nos géis.

Foi observado que a técnica de marcação por isóbaros TMT foi mais sensível que o DIGE, porém complementar. Devido a relativa baixa sensibilidade do DIGE podia ser esperado que a técnica de TMT sozinha identificasse todas as proteínas de interesse tornando as proteínas selecionadas por DIGE apenas um subconjunto do TMT. No entanto, quase 80 proteínas, representando 19% do total aqui identificado, vieram da análise por DIGE, além disso, por essa técnica foi possível observar quando as proteínas possuíam alterações em massa molecular e/ou ponto isoelétrico, o que nos leva a pensar em função alterada. A complementariedade dessas técnicas foi também observada por outros autores (Sinclair et al, 2011 e Westman et al 2012).

Diante da extensa lista de proteínas que obtivemos ao final dos experimentos, foi primordial definir critérios para a seleção dos potenciais fatores de virulência. Mas antes disso, para eliminar possíveis vieses de anotações dos dados e para manter nossos dados sempre de acordo com o banco de dados atualizado, foram realizadas várias análises de BLASTp. Isso foi necessário porque a extração de informações biológicas de banco de dados de domínio público enfrenta uma série de dificuldades, tais como a variedade do formato das fontes de dados e a incompatibilidade entre elas; a falta de interface simplificada para filtragens; tratamento dos dados em condições cada vez mais elaboradas e o controle de atualizações e manutenção desses bancos serem restritos às equipes locais (Davidson et al, 1995). Existem diversos bancos de dados de domínio público disponíveis para se consultar e minerar dados genômicos, proteômicos, metabolômicos e etc. Contudo, muitos desses bancos de dados não são longevos, ou seja, deixaram de ser atualizados e possuem dados defasados. Portanto restringimos nossas buscas por

informações dos dados proteômicos apenas a banco de dados atualizados constantemente e com boa reputação/uso pela comunidade científica.

O primeiro critério que adotamos para minerar os potenciais fatores de virulência dentre as proteínas identificadas como diferencialmente abundantes entre as cepas de alta (BH400) e baixa (BH46) virulência, foi a avaliação das interações dessas proteínas entre si, destacando aquelas nas quais havia participação de grande número de proteínas quer aumentadas, quer diminuídas em cada forma evolutiva. Observou-se aglomerados com muitas proteínas interagindo entre si, representadas por proteínas ribossomais e de regulação positiva da tradução, geralmente aumentadas entre as formas da cepa mais virulenta em relação a forma correspondente na cepa menos virulenta. Nesse contexto, vale a pena destacar as proteínas ribossomais 60S L6 e S20 e o Fator 5a de Iniciação em Eucariotos, que estavam aumentadas tanto nas formas promastigotas quanto nas amastigotas esplênicas de BH400. Esses achados são corroborados por dados da literatura, onde, em *Leishmania* spp proteínas relacionadas a ribossomos têm sido consideradas moléculas relevantes durante a infecção uma vez que, em algumas circunstâncias, modulam atividade celular e liberação de citocinas, tendo sido mostradas como bons candidatos a vacinação (Iborra et al., 2008, Rory et al., 2017). Além disso, foi demonstrado que as proteínas ribossomais em *Leishmania* spp podem ser alvo primário no mecanismo de ação de aminoglicosídeo (Shalev et al., 2015).

O critério seguinte na nossa seleção dos potenciais fatores de virulência foi identificar os processos biológicos que estavam enriquecidos em cada forma. A análise de Enriquecimento de Processos Biológicos, ou seja, a identificação de termos GO que estão significativamente super-representados em uma lista de genes/proteínas é frequentemente usado para adquirir informações iniciais sobre potenciais sentidos biológicos em um conjunto de dados. Em nosso trabalho, nas formas Amastigotas Axênicas, nenhum processo biológico estava enriquecido, mas simultaneamente nas formas Promastigota e Amastigota Esplênica da cepa 400 (mais virulenta) estavam enriquecidos os processos metabólicos: Celular, de Ácido Carboxílico, de Substância Orgânica, e Processo de Resposta ao Estresse. Além desses, nas formas promastigotas de 400, estavam também enriquecidos os Processos Metabólico Primário e de Biossíntese Celular. Isso nos leva a pensar que as formas da cepa mais virulenta têm aumento de proteínas que lhes permite crescimento mais rápido tanto por maior aporte energético quanto por maior síntese celular. Por outro lado, simultaneamente nas formas promastigotas e amastigotas esplênicas da cepa BH46 (menos virulenta) foi observado

enriquecimento do processo de biossíntese de compostos nitrogenados, enquanto nas formas amastigotas esplênicas dessa cepa estavam enriquecidos também os processos de biossíntese celular, expressão gênica e tradução. Entretanto, os processos enriquecidos não são representados por proteínas com abundância aumentada e sim por número de vezes que as proteínas de um mesmo processo é citada. Dessa forma, não podemos considerar que esses processos enriquecidos possuam aumento de abundância dessas proteínas, mas sim que essas funções estão mais alteradas para mais ou para menos. Tornando assim necessário investigar a abundância e as interações das proteínas envolvidas nos respectivos processos para a elucubração do papel biológico.

Nossa análise seguinte foi selecionar proteínas que foram identificadas simultaneamente com abundância aumentada em mais de uma forma na cepa mais virulenta. Estavam simultaneamente aumentadas em pelo menos duas formas evolutivas 14 proteínas, 8 delas em promastigota e amastigota esplênica, 5 em promastigota e amastigota axênica e 1 nas formas amastigotas (axênica e esplênica).

As proteínas com aumento de abundância em promastigota e amastigota esplênica foram Calpaína-like cisteína peptidase - Clan CA- family C2, uma proteína hipotética (ambas sem função biológica predita); 3 proteínas relacionadas com tradução (proteínas ribossomais 60S e 20S e fator de eucariótico de iniciação 5a) e 3 proteínas transportadoras de glicose (Impt1, Imgt2, Imgt3). As proteínas relacionadas com tradução foram discutidas anteriormente nas redes de interação. Quanto ao aumento da abundância das proteínas transportadoras de glicose nas formas mais virulentas, elas podem explicar a maior taxa de crescimento e maior infectividade em macrófagos dessa cepa em relação a menos virulenta que foi por nós observada (Pires et al., 2014), uma vez que já foi demonstrado que a taxa de crescimento dos parasitos *knockout* para os genes dessas proteínas foi menor em forma Promastigota e também a infectividade desses parasitos *knockout* em macrófagos foi reduzida drasticamente (Burchmore et al. 2003).

As cinco proteínas aumentadas simultaneamente nas formas promastigotas e amastigotas axênicas de BH400 foram: uma Proteína Hipotética e Proteína de Ligação-GTP Rab1 (ambas sem função biológica predita), 2 proteínas relacionadas com metabolismo celular, Galactoquinase-like e Vacuolar ATP Sintase Subunidade b (ambas anteriormente somente preditas em *Leishmania*) e Citocromo C Oxidase (Resposta a Estresse). Silverman e colaboradores (2008), classificaram a proteína Proteína de Ligação-GTP Rab1 como sendo candidata a fator de virulência em *L. donovani*, devido a sua associação com o transporte vesicular de proteínas, podendo regular o tráfego desse

transporte, afetando a secreção de proteínas do parasito. O complexo Citocromo C Oxidase quando ativo, desempenha um importante papel na sobrevivência do parasito no hospedeiro, e um dado que fortalece a nossa hipótese que selecionamos candidatos a fatores de virulência em *Leishmania*, é que a deleção do gene responsável pela transcrição do componente Ldp27 que compõe o complexo Citocromo C Oxidase em *L. donovani*, gerou parasitos com virulência diminuída em experimentos *in vitro* e *in vivo* (Dey et al. 2011). Somente a Proteína Carreadora de ADP, ATP estava simultaneamente aumentada em ambas as formas amastigotas de BH400. Essa proteína tem função biológica de transporte de membrana, mas em *Leishmania* ainda não havia sido encontrada, portanto até o momento, não foi estudada.

Por fim, selecionamos proteínas que foram identificadas simultaneamente com abundância diminuída em mais de uma forma de BH400. Foram selecionadas 20 proteínas que estavam simultaneamente diminuídas em pelo menos duas formas evolutivas, nas quais 6 em promastigota e amastigota esplênica, 2 em promastigota e amastigota axênica e 12 nas formas amastigotas (axênica e esplênica).

As oito proteínas com diminuição de abundância em promastigota e amastigota esplênica foram: três proteínas relacionadas com Biossíntese Celular GDP Manose Pirofosforilase, Proteína Associada a U3 snoRNA UTP11 e 1,2-Dihidroxi-3-keto-5-methylthiopenteno dioxigenase, esta, por sua vez, também relacionada à resposta ao estresse oxidativo; uma proteína relacionada ao metabolismo, a Ribonuclease Associada a Mitocôndria e uma proteína relacionada a movimentação e organização do citoesqueleto, a Kinesina K39. Foram encontradas também duas Proteínas Conservadas Hipotéticas e a Proteína de Choque Térmico HSP70.

As 12 proteínas com diminuição de abundância compartilhadas entre as formas amastigotas (Axênica e Esplênica) foram: ADF/Cofilina, relacionada com a organização do citoesqueleto, Piruvato Kinase e Fator de Iniciação da Tradução de Eucariotos subunidade 3, relacionadas com metabolismo celular e com a tradução, respectivamente. Duas proteínas componentes do complexo do Proteasoma, responsáveis pela proteólise, a Subunidade 1 alpha do Proteasoma e Subunidade reguladora do Proteasoma não-ATPase. Três Proteínas Conservadas Hipotéticas também foram encontradas; duas proteínas relacionadas com resposta a estresse e redução oxidativa, a Glutathione Peroxidase-like e a Peroxidoxina; e por fim, proteínas presentes na membrana do parasito, responsáveis por interagir com outras moléculas do hospedeiro e auxiliam na invasão celular, a PSA-38 e a Glicoproteína de Superfície de Membrana GP46/M-2.

A Proteína do Choque Térmico-70 (HSP-70) embora presente no diagrama de Venn (Figura 31) como diminuída em duas formas evolutivas do parasito (Promastigota e em Ama. Axênica), apresentou um aumento significativo de abundância em Amastigota Esplênica de BH400. Claramente é uma proteína que não podemos deixar de discuti-la, uma vez que desempenha um papel fundamental tanto em resposta ao choque térmico ou outro estresse, quanto em células em estado nativo. Uma vez que está envolvida com os processos de enovelamento, montagem, secreção, ativação e degradação, além de interagir com vários componentes de vias de sinalização que regulam o crescimento e o desenvolvimento celular. Além disso, é demonstrado que a ausência de HSP-70, leva a uma diminuição da replicação e da virulência do parasito (Folgueira *et al*, 2008). O aumento de abundância da HSP-70 em Amastigota Esplênica corrobora com a importância exercida por ela referente à visceralização e consequentemente, sobrevivência do parasito a um ambiente hostil. Através das análises de predição de interação dessa proteína, foi predita a sua interação com a co-Chaperona GrpE. Esta é um componente principal do complexo PAM, necessário para a translocação de peptídeos que contêm proteínas na membrana interna da matriz mitocondrial em um modo dependente de ATP. As co-chaperonas auxiliam na função de enovelamento das proteínas juntamente com as Chaperonas, e algumas delas possuem a própria atividade de Chaperonas, uma vez que possuem habilidade para prevenir agregação polipeptídica. Outras co-chaperonas apenas interagem com HSP-70 ou HSP-90, tendo assim uma função regulatória na atividade de enovelamento de proteínas (Mayer *et al*, 2005; Zamora-Veyl *et al*, 2005; Źmijewski *et al*, 2007).

Em Amastigota Esplênica e Axênica da cepa BH400, foi observado que a proteína ADF/Cofilina apresentou diminuição de abundância. Essa proteína possui uma grande importância no flagelo de formas Promastigotas, de acordo com Tammana e colaboradores em 2008. Segundo os autores, foram desenvolvidos parasitos da espécie *L. donovani knockout* para o gene da proteína ADF/Cofilina, e foi observado que os parasitos mutantes apresentaram redução no tamanho do flagelo e também movimentação severamente prejudicada. Além disso, os mutantes não apresentaram a formação de Paraflagelar ROD (PFR), uma estrutura do citoesqueleto essencial para a motilidade do parasito, além de apresentarem a estruturas semelhantes a vesículas por todo o flagelo. Portanto, a ADF/Cofilina desempenha um papel crucial no desenvolvimento do flagelo, e na mobilidade do parasito. Nossos dados mostraram que a ADF/Cofilina foi encontrada diminuída em BH400 em ambas as Amastigotas Axênica e Esplênica. Isso nos leva a crer

que, ausência/diminuição do tamanho do flagelo nessa forma evolutiva leva o parasito a sintetizar outras proteínas mais relevantes para a forma Amastigota.

Ainda sobre proteínas com importantes funções na forma Promastigota, a PSA-38S e a Glicoproteína de Superfície de Membrana GP46/M-2 estão presentes na superfície de muitas espécies de *Leishmania*, e estão envolvidas na interação proteína-proteína, auxiliando na adesão e invasão de macrófagos. Beetham e colaboradores (1997; 2003), observaram uma grande quantidade dessas proteínas/mRNA em promastigotas metacíclicas, e propuseram associação dessas proteínas com o status de virulência do parasito, uma vez que essas moléculas auxiliam na infectividade do parasito (Beetham et al, 1997; Beetham et al, 2003; Kedzierski et al, 2004; Devault et al, 2008). Essas referências corroboram nossos achados, uma vez que essas proteínas foram encontradas com aumento de abundância em Promastigota de BH400 em relação a BH46, e diminuídas em ambas Amastigotas Axênica e Esplênica.

O estresse oxidativo pode influenciar diretamente na sobrevivência dos Tripanossomatídeos. Nas interações entre parasito-hospedeiro, uma grande quantidade de intermediários Reativos de Oxigênio e Óxido Nítrico (ROI e NO) é gerada pelo hospedeiro para criar condições desfavoráveis para os agentes patogênicos invasores, e conseqüentemente para a sua eliminação. Portanto, a habilidade do parasito para evadir-se desses efeitos oxidativos está diretamente ligada à virulência e ao estabelecimento da infecção (Castro *et al*, 2002).

Proteína como a Peroxidoxina já foi descrita na literatura como sendo fator de virulência em *Leishmania* (Romao *et al*, 2009). Essa proteína foi encontrada neste trabalho tendo abundância diminuída em ambas Amastigotas, porém aumentada nas Promastigotas de ambas as cepas, com maior abundância na cepa virulenta (BH400). Essa proteína não é crucial apenas para a sobrevivência durante o estresse oxidativo, mas também aumenta a capacidade infectante do parasito, garantindo o estabelecimento e o sucesso da infecção. Além disso, essa proteína foi encontrada diminuída em ambas as Amastigotas Esplênica e Axênica, indicativo de que essa proteína possui uma grande importância principalmente para a forma Promastigota, uma vez que essa é a forma evolutiva a ter o primeiro contato com o ambiente hospedeiro. A Peroxidoxina pode atuar na preparação das promastigotas, tornando-as hábeis ao processo de infecção, alterando sua capacidade de invasão celular, e ainda, tornando-as mais resistentes ao processo oxidativo que se inicia assim que o parasito entra no ambiente do hospedeiro.

Foi demonstrada que há interação entre as proteínas Peroxidoxina e Triparredoxina, exercendo a função de detoxificação celular, sinalização na proliferação e processos de diferenciação, além de serem cruciais na defesa do parasito contra o estresse oxidativo (Castro *et al*, 2002). Em nosso trabalho, foi predita a interação direta dessas proteínas (Peroxidoxina e Triparredoxina) e com outras proteínas envolvidas na óxido-redução do parasito, manutenção e degradação, tais como a Glutathione Peroxidase; Poliubiquitina e Proteína Disulfide Isomerase. Iyer e colaboradores (2008) observaram que em *L. donovani* há um aumento da expressão de Triparredoxina após a exposição de H₂O₂, não havendo morte celular devido ao estresse induzido. Além disso, após a produção de parasitos transfectados super-expressando Triparredoxina, foi observado que houve um aumento de virulência e da carga parasitária. Esses parasitos também apresentaram um aumento de resistência a antimoniais, indicando que essa proteína pode estar envolvida na resposta à drogas e consequentemente, na sobrevivência do parasito.

Staniec e colaboradores (2015) demonstram que a proteína Calpain-Like Cysteine Peptidase Clan CA; Family C2 em bactérias da espécie *Porphyromonas gingivalis*, conferem resistência a proteólise e atuam na degradação de proteínas do sistema do complemento. Essa peptidase parece não apenas satisfazer necessidades nutricionais de *P. gingivalis*, mas também proteger a bactéria contra a ação do sistema imune (Staniec et al. 2015). Em *L. donovani*, a presença de Calpain-Like Cysteine Peptidase apresentava aumento de abundância em parasitos virulentos (Salotra et al. 2006). Volbrach e colaboradores em 2005, descrevem a Calpain-Like Cysteine Peptidase como tendo papel crucial na defesa celular perante a ação de óxido nítrico. Por fim, Sangenito (2009) e Branquinho (2013), evidenciaram que a manutenção de *T. cruzi* por longos períodos em cultivo in vitro, leva à diminuição da abundância de Calpain-Like Cysteine Peptidase, sugerindo que há uma relação direta entre essa proteína e a virulência do parasito. Todos esses trabalhos citados corroboram com os dados do nosso estudo, onde a Calpain-Like Cysteine Peptidase foi observada com aumento de abundância em Promastigota e Ama. Esplênica de BH400 quando comparada com a cepa BH46 de *L. infantum*.

A biossíntese do carboidrato denominado β -mannan é descrito como um importante fator de virulência em *L. mexicana* e depende do transporte das hexoses para o interior da célula. Esse carboidrato foi encontrado em baixas quantidades em parasitos cujo gene responsável pelos Transportadores de Glucose 1, 2 e 3 havia sido silenciado. Rodríguez-Contreras e colaboradores (2006) observaram que esses parasitos knockout ainda foram capazes de sintetizar glicoconjugados e β -mannan em menor escala, usando

a gliconeogênese para produzir precursores de hexose-fosfato. Entretanto, níveis reduzidos desse carboidrato podem contribuir para a incapacidade de sobrevivência do parasito em ambiente com escassez de nutriente e estresse (Ralton *et al.* 2003). A proteína 20S do Proteassoma subunidade Alpha 5 faz parte do proteassoma, complexo proteico responsável pela degradação de uma grande variedade de proteínas marcadas para destruição por ubiquitinação ou por outros meios (Malygin *et al.*, 2000). Em nosso trabalho, essa proteína foi encontrada com aumento de abundância em Amastigota Esplênicas de ambas as cepas, e diminuída em promastigotas, também de ambas as cepas. Através da predição de interação das proteínas, foi observado que essa proteína interage com outras subunidades do proteassoma encontradas em nosso trabalho, tais como as subunidades Alpha 1, 2 e 3 do Proteassoma, além da subunidade não-reguladora de ATPase. De acordo com Käser e colaboradores (2000), as Subunidades Alpha do Proteassoma parecem ser essenciais para a biogênese e manutenção da mitocôndria através da degradação de polipeptídeos com erro de dobramento ou montagem e controle de níveis de proteínas regulatórias, garantindo a integridade do genoma mitocondrial, expressão gênica e montagem de proteínas. (Käser *et al.* 2000)

Além dessas proteínas, foram encontradas várias outras com diferença na abundância e que fazem parte do processo biológico de Resposta ao Estresse, tais como: 1,2-Dihidroxi-3-ceto-5-metiltiopenteno dioxigenase; Subunidade alfa 2-oxoisovalerate desidrogenase; 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA redutase; Subunidade V do Citocromo C oxidase; Diidrolipoamida desidrogenase; Glutamato desidrogenase; glutational peroxidase-like; Proteína de choque térmico; Superoxide dismutase de ferro; Metalloprotease, Clan ME, Família M16; Malato desidrogenase mitocondrial; NADH-Citocromo b5 redutase; Fumarato redutase dependente de NADH; Álcool desidrogenase dependente de NADP; Oxidoreductase; Poliprenol redutase; Pirrolina-5-carboxilato redutase; Piruvato desidrogenase E1; Ribonucleoproteína p18, precursora mitocondrial; S-adenosilhomocisteína hidrolase; Proteína 14-3-3 like; Fator de Elongação 2; Endorribonuclease L-PSP (pb5); e Tiol-dependente 1 redutase.

Algumas proteínas foram encontradas apresentando contradição nos valores de abundâncias entre as técnicas. Ao analisarmos, foi observado que essas proteínas apresentavam uma grande alteração nos valores de Massa Molecular e/ou Ponto Isoelétrico experimental no DIGE quando comparados aos valores preditos. Isso pode ter ocorrido devido a modificações pós-traducionais, tais como a ubiquitinação, oxidação, glicosilação, fosforilação, metilação, acetilação, dentre outras, comuns em

Trypanosomatídeos. Cada uma dessas modificações alteram a massa molecular da proteína modificada. Em alguns casos, podendo haver vários sítios dessa modificação, leva a uma grande alteração na massa molecular e consequentemente a posição do spot no gel (Jensen, 2006). Além disso, é provável que as funções exercidas por essas proteínas também estejam alteradas. (Clayton et al, 2002; Rosenzweig et al, 2008, Cuervo et al, 2010 e Paape et al, 2011). Portanto, foi considerada a abundância obtida na técnica de marcação por isóbaros TMT. Essas proteínas estão representadas no Apêndice 1.

Em suma, no presente estudo foram encontradas várias proteínas já descritas como fatores de virulência em outras espécies de *Leishmania*, todas identificadas simultaneamente, além da quantificação da abundância dessas proteínas observadas entre as formas evolutivas em ambas as cepas. Esses dados comparativos podem nos direcionar para proteínas importantes e determinantes no fenótipo virulento do parasito. Por fim, vale ressaltar que foi observado através da rede de interações que várias proteínas descritas como fatores de virulência em *Leishmania*, muitas vezes interagem entre si. Sabemos que uma proteína não consegue agir sozinha em um sistema, pois as funções celulares são complexas e são tipicamente o resultado de uma ação coordenada de várias proteínas que atuam em montagens moleculares ou caminhos para alcançar uma tarefa específica. Portanto, as redes de interações preditas podem contribuir de forma significativa para a nossa compreensão das relações entre proteínas e fenótipos, gerando hipóteses que poderão ser testadas em estudos futuros.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A utilização das duas técnicas de proteoma quantitativo, de maneira complementar, foi de grande importância para expandir nosso universo de proteínas com diferenças de abundância, uma vez que ambas as técnicas possuem vantagens e limitações. Observamos que 68,4% das proteínas foram encontradas na técnica de marcação por isóbaros TMT, porém, 19,1% das proteínas desse estudo (79 proteínas), foram encontradas no DIGE, um número considerável que a complementariedade das técnicas nos permitiu utilizá-las no trabalho.

A cepa BH400 apresenta uma maior virulência em relação à BH46 e simultaneamente apresenta também maior número de proteínas com abundância aumentada em Amastigota Esplênica e em Promastigota, quando comparadas com as mesmas formas evolutivas da cepa BH46, várias dessas proteínas já descritas como fatores de virulência em *Leishmania* spp. Além disso, foi observado que o processo biológico de Resposta a Estresse apresentava enriquecimento em Amastigota Esplênica e em Promastigota da cepa BH400. Em contrapartida, esse processo biológico não apresentava enriquecimento em BH46.

Foi observado uma maior semelhança entre a abundância das proteínas em Promastigota e Amastigota Axênica do que em Amastigota Esplênica, independente da cepa. Esse dado nos abre perspectivas para analisar as diferenças e semelhanças do proteoma entre Promastigotas, Amastigotas Axênicas e Esplênicas.

No momento, acreditamos que as proteínas que estão simultaneamente aumentadas (n=14) e simultaneamente diminuídas (n=20) em mais de uma forma da cepa mais virulenta podem representar potenciais fatores de virulência e devem ser avaliados como tal nos próximos trabalhos do nosso grupo.

Muitas outras proteínas aqui identificadas podem ser importantes fatores de virulência e não foram destacadas pelos critérios que adotamos. Esse é um risco e também uma necessidade quando definimos os critérios de mineração dos dados. Todavia, futura relação das proteínas poderá vir a ser analisada por outros critérios e os nossos resultados extrapolarem o que foi destacado aqui.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ASLETT, M. et al. TriTrypDB: a functional genomic resource for the Trypanosomatidae. *Nucleic acids research*, v. 38, p. D457–62, 2010.
- MAERE, S.; HEYMANS, K.; KUIPER, M. BiNGO: A Cytoscape plugin to assess overrepresentation of Gene Ontology categories in biological networks. *Bioinformatics*, v. 21, p. 3448-3449, 2005.
- CONESA, A; GÖTZ, S.; "Blast2GO: A Comprehensive Suite for Functional Analysis in Plant Genomics", *International Journal of Plant Genomics*, Vol. 2008. 2008, pp. 1-13.
- CONESA, A.; GÖTZ, S.; GARCIA-GOMEZ, M.; TEROL, J.; TALON, M.; ROBLES, M. "Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research", *Bioinformatics*, Vol. 21, September, 2005, pp. 3674-3676.
- ACHOUR, Y.B; CHENIK, H; DELLAGI, K. Identification of a Disulfide Isomerase Protein of *Leishmania* major as a Putative Virulence Factor. *Infect. Immun.* V.70, p.3576, 2002.
- ALBRECHT, D.; KNIEMEYER, O.; BRAKHAGE, A.; GUTHKE, R.; Missing values in gel-based proteomics. *Proteomics*, p.1202-1211, 2010.
- ALTSCHUL, S. F. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs, v. 25, p. 3389-3402, 1997.
- ANDERSEN, J.S.; MANN, M. Functional genomics by mass spectrometry. *FEBS Lett*, v.480, p.25-31. 2000.
- ANDERSON, L.; SEILHAMER, J.A. comparison of selected mRNA and protein abundances in human liver. *Electrophoresis*, v.18, p.533–7, 1997.
- BARGIS-SURGEY, P; LAVERGNE, J-P; REBOUD, J-P. Interaction of elongation factor eEF-2 with ribosomal P proteins. *Eur. J. Biochem.* v. 262, p. 606-611, 1999.
- BATES, P.A. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. *Int J Parasitol.*v.37, p.1097–106, 2007.

BEATTIE, L.; EVANS, K.J.; KAYE, P.M.; SMITH, D.F. Transgenic *Leishmania* and the immune response to infection. *Parasite Immunology*, v.30, p.255-66, 2008.

BEN ACHOUR, Y.; CHENIK, M. Identification of a disulfide isomerase protein of *Leishmania* major as a putative virulence factor. *Infection and Immunity*, v.70. p. 3576-3585. 2002.

BERKELMAN, T.; STENSTED. 2-D Electrophoresis: Principles and Methods. T2004 GE Healthcare, Edition AC (80-6429-60).

BLACKWELL, J.M.; FAKIOLA, M.; IBRAHIM, M.E.; JAMIESON, S.E.; JERONIMO, S.B. Genetics and visceral *Leishmaniasis*: of mice and man. *Parasite Immunology*, v.31, p.254–266, 2009.

BOUTET E, LIEBERHERR D, TOGNOLLI M, SCHNEIDER M, BANSAL P, BRIDGE AJ, POUX S, BOUGUELERET L, XENARIOS I. UniProtKB/Swiss-Prot, the Manually Annotated Section of the UniProt KnowledgeBase: How to Use the Entry View. *Methods Mol Biol.* 2016;1374:23-54.

BRITO, R.; GUIMARÃES, F.; VELLOSO, J. P.; CORRÊA-OLIVEIRA, R.; RUIZ, J. C.; REIS, A. B.; RESENDE, D. - Immunoinformatics Features Linked to *Leishmania* Vaccine Development: Data Integration of Experimental and In Silico Studies. *Int. J. Mol. Sci.* v.18, 2017.

BRITTINGHAM, A.; MILLER, MA.; DONELSON, J.E.; WILSON, M.E. Regulation of GP63 mRNA stability in promastigotes of virulent and attenuated *Leishmania* chagasi. *Molecular and Biochemical Parasitology*, v.112, p.51-59. 2001.

BROBEY, R.K; SOONG, L. Establishing a liquid-phase IEF in combination with 2-DE for the analysis of *Leishmania* proteins. *Proteomics* v.7 p.116–120, 2007.

BROTHERTON, M.C; RACINE, G; FOUCHER, A.L; PAPADOPOULOU, B; OUELLETTE, M. Analysis of Stage-Specific Expression of Basic Proteins in *Leishmania infantum*. *J. Proteome Research.* v.9, p.3842-3853, 2010.

CAIAFFA, W.; ALMEIDA, M.; OLIVEIRA, C. The urban environment from the health perspective: the case of Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. *Cadernos de saúde pública*, v.17. p.958-967. 2001.

CAO, Z.; HAN, Z.; SHAO, Y.; LIU, X.; WANGLIU, S. Proteomics analysis of differentially expressed proteins in chicken trachea and kidney after infection with the highly virulent and attenuated coronavirus infectious bronchitis virus in vivo. *Proteome Science*, v.10, n.24, 2012.

CARNIELLI, J.B.; ANDRADE, H.M.; PIRES, S.F.; CHAPEAUROUGE, A.D.; PERALES, J.; MONTI-ROCHA, R.; CARVALHO, S.F.; RIBEIRO, L.P.; DIETZE, R.; FIGUEIREDO, S.G.; LEMOS, E.M. Proteomic analysis of the soluble proteomes of miltefosine-sensitive and -resistant *Leishmania infantum* chagasi isolates obtained from Brazilian patients with different treatment outcomes. *J Proteomics*. v.108, p.198-208. 2014.

CARVALHO, L.P.; PASSOS, S.; DUTRA, W.O.; SOTO, M.; ALONSO, C.; GOLLOB, K.J.; CARVALHO, E.M.; RIBEIRO DE JESUS, A. Effect of LACK and KMP11 on IFN-gamma production by peripheral blood mononuclear cells from cutaneous and mucosal *Leishmaniasis* patients. *Scand J Immunol*, v.61, p.337–342, 2005.

CASTELLANO, L.R. Resposta immune anti-*Leishmania* e mecanismos de evasão. *Vitae academia biomédica digital*, v.25. 2005.

CASTRO, H; SOUSA, C; SANTOS, M; TOMAS, A. M. Complementary antioxidant defense by cytoplasmic and Mitochondrial peroxiredoxins in *Leishmania infantum*. *Free Radical Biology & Medicine*, v. 33, n. 11, p. 1552–1562, 2002.

CHANG, J. Comparative proteomics: characterization of a two-dimensional gel electrophoresis system to study the effect of aging on mitochondrial proteins. *Mech. Ageing Dev*, v.124, p.33-41. 2003.

CHANG, K.P.; BRADFORD, S. Molecular determinants and regulations of *Leishmania* virulence. *Kinetoplastid Biology and Disease*, v.1. p.1-7. 2002.

CHAPPUIS, F.; SUNDAR, S.; HAILU, A. Visceral *Leishmaniasis*: what are the needs for diagnosis, treatment and control? Nature Reviews Microbiology, v.5, p.873-882. 2007.

CHAWLA, B.; JHINGRAN, A.; MADHUBALA, R. Paromomycin Affects Translation and Vesicle-Mediated Trafficking as Revealed by Proteomics of Paromomycin – Susceptible –resistant *Leishmania donovani*. PLoS ONE, v.6, p.1-12, 2011.

CHOUDHURY, R.; DAS, P.; BHAUMIK, S.K.; DE, T.; CHAKRABORTI, T. In situ immunolocalization and stage-dependent expression of a secretoryserine protease in *Leishmania donovani* and its role as a vaccine candidate. Clin Vaccine Immunol, v.17, p.660–667, 2010.

CLAYTON, C.E. Life without transcriptional control? From fly to man and back again Embo J, v.21 p.1881–8, 2002.

CLINE MS, SMOOT M, CERAMI E, KUCHINSKY A, LANDYS N, WORKMAN C, CHRISTMAS R, AVILA-CAMPILO I, CREECH M, GROSS B, HANSPERS K, ISSERLIN R, KELLEY R, KILLCOYNE S, LOTIA S, MAERE S, MORRIS J, ONO K, PAVLOVIC V, PICO AR, VAILAYA A, WANG PL, ADLER A, CONKLIN BR, HOOD L, KUIPER M, SANDER C, SCHMULEVICH I, SCHWIKOWSKI B, WARNER GJ, IDEKER T, BADER GD. Integration of biological networks and gene expression data using Cytoscape. Nat Protoc. 2007;2(10):2366-82.

COSTA, M.M.; ANDRADE. H.M; BARTHOLOMEU, D.C; PIRES, S.F; CHAPEAUROUGE, A.D; GAZZINELLI, R.T. Analysis of *Leishmania chagasi* by 2-D Difference Gel Eletrophoresis (2-D DIGE) and Immunoproteomic: Identification of Novel Candidate Antigens for Diagnostic Tests and Vaccine. J. Proteome Res. V.10, p.2172–2184, 2011.

CUERVO, P, DE JESUS, JB, SABOIA-VAHIA, L, MENDONCA-LIMA, L, DOMONT, GB, CUPOLILLO, E. Proteomic characterization of the released/secreted proteins of *Leishmania* (Viannia) braziliensis promastigotes. J Proteomics, v.73, p. 79–92, 2009.

CUERVO, P. DOMONT, G.B.; DE JESUS, J.B. Proteomics of trypanosomatids of human medical importance. Journal of Proteomics, v.73, p.845-867, 2010.

CUERVO, P.; JESUS, J.B.; JUNQUEIRA, M.; MENDONÇA-LIMA. L.; GONZÁLEZ, L.J. Proteome analysis of *Leishmania* (Viannia) braziliensis by two-dimensional gel

electrophoresis and mass spectrometry. *Molecular & Biochemical Parasitology*. V.154, p.6-21. 2007.

CUNNINGHAM, A.C. Parasitic adaptive mechanisms in infection by *Leishmania*. *Experimental and Molecular Pathology*.v.72, p.132-141, 2002.

DE ASSIS, R.R.; IBRAIM, I.C.; NOGUEIRA, P.M.; SOARES, R.P.; TURCO, S.J. Glycoconjugates in New World species of *Leishmania*: Polymorphisms in lipophosphoglycan and glycoinositolphospholipids and interaction with hosts. *Biochim. Biophys. Acta*, 2011.

DEA-AYUELA, M.A.; GUTIERREZ, L.O.; FERNANDEZ, F. Changes in the proteome and infectivity of *Leishmania infantum* induced by in vitro exposure to a nitric oxide donor. *International Journal of Medical Microbiology*, v.299, p.221–232, 2009.

DENISE, H.; POOT, J.; JIMÉNEZ, M.; AMBIT, A.; HERRMANN, D.C.; VERMEULEN, A.N.; COOMBS, G.H.; MOTTRAM, J.C. Studies on the CPA cysteine peptidase in the *Leishmania infantum* genome strain JPCM5. *BMC Mol Biol*, v.13, n.42, 2006.

DOUGHERTY, M.K.; MORRISON, D.K. Unlocking the code of 14-3-3. *J Cell Sci*, v.117, p.1875–1884, 2004.

EL FAKHRY, Y.; OUELLETTE, M.; PAPADOPOULOU, B. A proteomic approach to identify developmentally regulated proteins in *Leishmania infantum*. *Proteomics*, v.2, p.1007–1017, 2002.

FARRELL, J.P. *Leishmania donovani*: acquired resistance to visceral *Leishmaniasis* in the golden hamster. *Exp Parasitol*, v.40, p.89–94, 1976.

FENN, J.B.; MANN, M.; MENG, C.K.; WONG, S.F.; WHITEHOUSE, C.M. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science*, v.246 p.64–71, 1989.

FOLGUEIRA, C.; CARRIÓN, J.; MORENO, J.; SAUGAR, J.M.; CAÑAVATE, C. REQUENA, J.M. Effects of the disruption of the HSP70-II gene on the growth,

morphology, and virulence of *Leishmania infantum* promastigotes. Int. Microbiol, v.11, p.81-89, 2008.

FORGBER M, BASU R, ROYCHOUDHURY K, et al. Mapping the antigenicity of the parasites in *Leishmania donovani* infection by proteome serology. PLoS One, v.40, 2006.

FOUCHER AL, PAPADOPOULOU B, OUELLETTE M. Prefractionation by digitonin extraction increases representation of the cytosolic and intracellular proteome of *Leishmania infantum*. J Proteome Res, v.7, p. 1741–50, 2006.

GANNAVARAN, S; DEBRABANT, A. Programmed cell death in *Leishmania*: biochemical evidence and role in parasite infectivity. Front Cell Infect Microbiol v.2, 2012.

GIFAWESEN, C.; FARRELL, J.P. Comparison of T-cell responses in self-limiting versus progressive visceral *Leishmania donovani* infections in golden hamsters. Infect Immun v.57, p.3091–3096, 1989.

GOMEZ, M.A.; CONTRERAS, I.; HALLÉ, M.; TREMBLAY, M.L.; MCMASTER, R.W.; OLIVIER, M. *Leishmania* GP63 alters host signaling through cleavage-activated protein tyrosine phosphatases. Sci Signal, v.2, n.58, 2009.

GONTIJO, C. MELO, M. Leishmaniose Visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. Revista Brasileira de Epidemiologia. v.7, p.338-349, 2004.

GÖRG, A.; KLAUS, A.; LÜCK, C.; WEILAND, F.; WEISS, W. Two-Dimensional Electrophoresis with Immobilized pH Gradients for Proteome Analysis. Technische Universität München, 2007.

GÖRG, A.; WEISS, W. GÜNTHER, S. Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. Proteomics, v.4, p.3665–3685, 2004.

GYGI, S.P.; ROCHON, Y.; FRANZA, B.R.; AEBERSOLD, R. Correlation between protein and mRNA abundance in yeast. Mol Cell Biol, v.19, p.1720–30, 1999.

HEIKKILA, T.; THIRUMALAIRAJAN, S.; DAVIES, M. The first de novo designed inhibitors of *Plasmodium falciparum* dihydroorotate dehydrogenase. Bioorg Med Chem Lett, v.16, p.88–92, 2006.

HEYWOOD et al., 2011- HEYWOOD, W.E.; MMADGETT, T.E.; WANG, D.; WALLINGTON, A.; HOGG, J.; MILLS, K.; AVENT, N.D. 2D DIGE analysis of maternal plasma for potential bi-omarkers of Down Syndrome. *Proteome Science*. v.9, n.56, p. 1-10, 2011

HERTZ-FOWLER, C.; PEACOCK, C.S.; WOOD, V. GeneDB: a resource for prokaryotic and eukaryotic organisms. *Nucleic Acids Res*, v.32, p.339–43, 2004.

HSIAO, C.H.; YAO, C.; STORLIE, P.; DONELSON, J.E.; WILSON, M.E.; The major surface protease (MSP or GP63) in the intracellular amastigote stage of *Leishmania chagasi*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, v.157, p.148-159, 2008.

IBORRA, S.; PARODY, N.; ABANADES, D.R.; BONAY, P.; PRATES, D.; NOVAIS, F.O.; BARRAL-NETTO, M.; ALONSO, C.; SOTO, M. Vaccination with the *Leishmania* major ribosomal proteins plus CpG oligodeoxynucleotides induces protection against experimental cutaneous *Leishmaniasis* in mice. *Microb. Inf. Inst. Pasteur*, v.10, 2008.

ILG, T. Proteophosphoglycans of *Leishmania*. *Parasitol Today*, v.16, p.489–497, 2000.

ILG, T.; MONTGOMERY, J.; STIERHOF, Y.D.; HANDMAN, E. Molecular cloning and characterization of a novel repeat-containing *Leishmania* major gene ppg1, that encodes a membrane-associated form of proteophosphoglycan with a putative glycosylphosphatidylinositol anchor. *J Biol Chem*, v.274, p.31410–31420, 1999.

IVENS, A.C.; PEACOCK, C.S.; WORTHEY, E.A. The genome of the kinetoplastid parasite. *Leishmania* major. *Science*, v.309, p.436–42, 2005.

IYER, J.P.; KAPRAKKADEN, A.; CHOUDHARY, M.L.; SHAHA, C. Crucial role of cytosolic trypanothione peroxidase in *Leishmania donovani* survival, drug response and virulence. *Molecular Microbiology* v.68, p.372–391, 2008.

JAIN, R.; GHOSHAL, A.; MANDAL, C.; SHAHA, C. *Leishmania* cell surface prohibitin: role in host-parasite interaction. *Cell Microbiol*, v.12, p.432–452, 2010.

JARDIM, A.; FUNK, V.; CAPRIOLI, R.M.; OLAFSON, R.W. Isolation and structural characterization of the *Leishmania donovani* kinetoplastid membrane protein-11, a major immunoreactive membrane glycoprotein. *Biochem J*, v.305, p.307–313, 1995.

JENSEN, O.N. Interpreting the protein language using proteomics. Nature Reviews, Molecular Cell Biology, v.7, 2006.

KADENBACH, B, ARNOLD S, LEE I, HÜTTEMANN, M. The possible role of cytochrome c oxidase in stress-induced apoptosis and degenerative diseases. Biochim Biophys Acta.v.12, p. 400-8, 2004.

KARAS, M.; BACHMANN, D.; BAHR, U.; HILLENKAMP, F.; Matrix-assistedultraviolet laser desorption of non-volatile compounds. International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes, v.78, p.53–68, 1987.

KEDZIERSKI, L; MALBY, R; SMITH, B; HANDMAN, E. Structure of *Leishmania Mexicana* Phosphomannomutase Highlights Similarities with Human Isoforms. J. Mol. Biol. v.363, p.215–227, 2006.

KUSHAWAHA, R.; GUPTA, AMOGH, A.; SAHASRABUDDHE, S. Elongation factor-2, a Th1 stimulatory protein of *Leishmania donovani*, generates strong IFN- γ and IL-12 response in cured *Leishmania*-infected patients/hamsters and protects hamsters against *Leishmania* challenge. J Immunol,v.187,p.6417-6427,2011.

LACERDA, DI.; LÉA NUNES, MP. Kinetoplastid membrane protein-11 exacerbates infection with *Leishmania amazonensis* in murine macrophages. Mem Inst Oswaldo Cruz, v.107, p.238-245, 2012.

LAISON, R.; SHAW, J. Evolution, classification and geographical distribution. The *Leishmaniasis* in Biology and medicine. London. v.1, p.1-120, 1987.

LAISON, R.; SHAW, J. The role of animals in the epidemiology of South American *Leishmaniasis*.. Biology of the Kinetoplastida.Academic Press, v.1, p.1-120, 1979.

LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. Lehninger Princípios de Bioquímica. Sarvier, 2002.

LEIFSO, K.; COHEN-FREUE, G.; DOGRA, G.; MURRAY, A.; MCMASTER, W.R. Genomic and proteomic expression analysis of *Leishmania* promastigote and amastigote life stages: The *Leishmania* genome is constitutively expressed. Molecular & Biochemical Parasitology,V.152, p.35–46,2007.

LIEKE, T.; NYLÉN, S.; EIDSMO, L.; MCMASTER, W.R.; MOHAMMADI, A.M.; KHAMESIPOUR, A.; BERG, L.; AKUFFO, H. *Leishmania* surface protein gp63 binds directly to human natural killer cells and inhibits proliferation. Clin Exp Immunol, v.153, p.221–230, 2008.

MALYGIN, A.A.; SHAULO, D.D.; KARPOVA, G. Proteins S7, S10, S16 and S19 of the human 40S ribosomal subunit are most resistant to dissociation by salt. Biochimica et Biophysica Acta, v.1494, p.213-216, 2000.

MAROUGA et al., 2005 MAROUGA, R.; DAVID, S.; HAWKINS, E. The development of the DIGE system: 2D fluorescence difference gel analysis technology. Anal Bioanal Chem. v.382, p. 669–678, 2005)

MATLASHEWSKI, G. *Leishmania* infection and virulence. Medical Microbiology and Immunology, v.190, p.37-42, 2001.

MATOS, D; FACCIOLI, L; MENDONÇA, S. Kinetoplastid membrane protein-11 is present in promastigotes and amastigotes of *Leishmania amazonensis* and its surface expression increases during metacyclogenesis. Mem Inst Oswaldo Cruz, v. 105, p. 341-347, 2010.

MAYER, M. P.; BUKAU, B. Hsp70 chaperones: Cellular functions and molecular mechanism. CMLS, Cell. Mol. Life Sci. v.62, 2005.

MCCARTHY, F. M. AgBase: a functional genomics resource for agriculture. BMC Genomics, v. 7, p. 229, 2006.

MCKERROW, J.H.; CAFFREY, C.; KELLY, B.; LOKE, P.; SAJID, M. Proteases in parasitic diseases. Ann Rev Pathol, v.1, p.497–536, 2006.

MCNICOLL, F.; DRUMMELSMITH, J.; MÜLLER, M.; MADORE, E.; BOILARD, N.; OUELLETTE, M.; PAPADOPOULOU, B. A combined proteomic and transcriptomic approach to the study of stage differentiation in *Leishmania infantum*. Proteomics, v.6, p.3567-3581, 2006.

MENDES TA, LOBO FP, RODRIGUES TS, RODRIGUES-LUIZ GF, DAROCHA WD, FUJIWARA RT, TEIXEIRA SM, BARTHOLOMEU DC. Repeat-enriched proteins are

related to host cell invasion and immune evasion in parasitic protozoa. *Mol Biol Evol.* 2013 Apr;30(4):951-63.

MOJTAHEDI, Z; CLOS, J; KAMALI-SARVESTANI, E. *Leishmania major*: Identification of developmentally regulated proteins in procyclic and metacyclic promastigotes. *Experimental Parasitology* v.119, p. 422–429, 2008.

MORALES, M.A.; WATANABE, R.; DACHER, M.; CHAFEY, P.; OSORIO, Y.; FORTÉA, J.; SCOTT, D.A.; BEVERLEY, S.M.; OMMEN, G.; CLOS, J.; HEM, S.; LENORMAND, P.; ROUSSELLE, J.C.; NAMANE, A.; SPÄTH, G.F. Phosphoproteome dynamics reveal heat-shock protein complexes specific to the *Leishmania donovani* infectious stage. *PNAS* , v.107, n.18, 2010.

MOTTRAM, J.C.; BROOKS, D.R.; COOMBS, G.H. Roles of cysteine proteinases of trypanosomes and *Leishmania* in host–parasite interactions. *Curr Opin Microbiol*, v.1, p.455–60, 1998.

MUKHOPADHYAY, S.; SEN, P.; MAJUMDER, H.K.; ROY, S. Reduced expression of lipophosphoglycan (LPG) and kinetoplastid membrane protein (KMP)-11 in *Leishmania donovani* promastigotes in axenic culture. *J Parasitol*, v.84, p.644-647, 1998.

MUNDODI, V.; KUCKNOOR, A.S.; GEDAMU, L. Role of *Leishmania (Leishmania)* chagasi amastigote cysteine protease in intracellular parasite survival: studies by gene disruption and antisense mRNA inhibition. *BMC Mol Biol*, v.6, n. 3, 2005.

NEUBER, H. *Leishmaniasis*. *Journal Der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft*, v.6, p.754-764, 2008.

NEVES, DP.; LINARDI, P.M.; MELO, A.L. *Parasitologia Humana*. Atheneu, 11^a Ed. 2005.

NUGENT, P.G.; KARSANI, S.A.; WAIT, R.; TEMPERO, J.; SMITH, D.F. Proteomic analysis of *Leishmania mexicana* differentiation. *Mol Biochem Parasitol*, v.136, p.51–62, 2004.

O' FARREL, P.H. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem*, v.250, p.4007-4021, 1975.

OLIVEIRA, D.; GOUVEIA, J.J.; DINIZ, N.; PACHECO, A.C. Pathogenomics Analysis of *Leishmania* spp.: Flagellar Gene Families of Putative Virulence Factors. Journal of Integrative Biology, v.9, p.173-193, 2008.

OTT, K.J.; HANSON, W.L.; STAUBER, L. Course of infection of *Leishmania donovani* in hamsters inoculated by the intraperitoneal route. J Parasitol, v.53, p.641–645, 1967.

OUELLETTE, M.; PAPADOPOULOU, B. *Leishmaniasis*: drugs in the clinic, resistance and new developments. Drugs Resist Updat, v.7 n.4-5, p.257-266, 2004.

PAAPE, D; AEBISCHER, T. Contribution of proteomics of *Leishmania* spp. to the understanding of differentiation, drug resistance mechanisms, vaccine and drug development. Journal of Proteomics.P.1614-1624, 2011.

PANCHOLI V. Multifunctional alpha-enolase: its role in diseases. Cell Mol Life Sci. v.58 p.902-20, 2001.

PANDEY, A.; MANN, M. Proteomics to study genes and genomes. Nature, v.405, p.837-846, 2000.

PATTON, W.F Detection technologies in proteome analysis. J. Chromatography, v.771, p.3-31, 2002.

PEACOCK, C.S.; SEEGER, K. HARRIS, D. Comparative genomic analysis of three *Leishmania* species that cause diverse human disease. Nat Genet, v.39, p.839–47, 2007.

PEARSON, R.D.; COX, G.; JERONIMO, S.M.B.; CASTRACANE, J.; DREW, J.S.; EVANS, T. Visceral *Leishmaniasis*: A model for infection-induced cachexia. Amer J Trop Med Hyg, v.47, p.8-15, 1992.

PEREIRA, A.S. Challenges of Analytical chemistry in face of the needs of the pharmaceutical industry. Química Nova, v.28, p.107-111, 2005.

PESCHER, P.; BLISNICK, T.; BASTIN, P.; SPÄTH, G. Quantitative proteome profiling informs on phenotypic traits that adapt *Leishmania donovani* for axenic and intracellular proliferation. Cellular Microbiology, v.13, p.978-991, 2011.

PETERS, N.C.; EGEN, J.G.; SECUNDINO, N.; DEBRABANT, A.; KIMBLIN, N.; KAMHAWI, S.; LAWYER, P.; FAY, M.P.; GERMAIN, R.N.; SACKS, D. In vivo imaging reveals an essential role for neutrophils in *Leishmaniasis* transmitted by sand flies. *Science*, v.322, p.1634-1634, 2008.

PETRAK, J.; IVANEK, R.; TOMAN, O.; CMEJLA, R.; CMEJLOVA, J.; VYORAL, .; ZIVNY, J.; VULPE, C. D. Déjà vu in proteomics. A hit Parade of repeatedly identified differentially expressed proteins. *Proteomics*, v.8, p. 1744–1749, 2008.

PIRES, S.F.; FIALHO, LC; SILVA, S.O.; MELO, M.N.; SOUZA, C.C.; TAFURI, W.L.; ROMERO, B.O.; ANDRADE, H.M. Identification of Virulence Factors in *Leishmania infantum* Strains by a Proteomic Approach. *Journal of Proteome Res.*, v.13, p.1860–1872. 2014.

POOT, J.; DENISE, H.; HERRMANN, D.C.; MOTTRAM, J.C.; COOMBS, G.H.; VERMEULEN, A.N. Virulence and protective potential of several Cysteine peptidaseknockout strains of *Leishmania infantum* in hamsters. In *Experimental challenge models for canine Leishmaniasis in hamsters and dogs, optimization and application in vaccine research*. Netherlands: Utrecht University press; p.93–107, 2006.

PROUDFOOT, L.; O'DONNELL, C.A.; LIEW, F.Y. Glycoinositolphospholipids of *Leishmania* major inhibit nitric oxide synthesis and reduce leishmanicidal activity in murine macrophages. *Eur J Immunol*, v.25 p.745–750, 1995.

R Core Team (2013). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.

REGIDOR-CERRILLO, J.; ÁLVAREZ-GARCÍA, G.; PASTOR-FERNÁNDEZ, I.; ORTEGA-MORA, L.M. Proteome expression changes among virulent and attenuated *Neospora caninum* isolates. *Journal of Proteomics*, v.75, p.2306-2318, 2012.

RIÇA-CAPELA, M.J.; CORTES, S.; LEANDRO, C.; PELETEIRO, M.C.; CAMPINO, L. Immunological and histopathological studies in a rodent model infected with *Leishmania infantum* promastigotes or amastigotes. *Parasitology Research*, v.89, p.163-169, 2003.

RODRIGUES, V.J.R.; SANTANA DA SILVA, J.; CAMPOS-NETO, A. Selective inability of spleen antigen presenting cells from *Leishmania donovani* infected hamsters to mediate specific T cell proliferation to parasite antigens. *Parasite Immunol*, v.14, p.49–58, 1992.

ROMAO, S.; CASTRO, H.; SOUSA, C.; CARVALHO, S.; TOMÁS, A. The cytosolic trypanothione of *Leishmania infantum* is essential for parasite survival. *International Journal for Parasitology*, 2009.

ROSENZWEIG, D.; SMITH, D.; OPPERDOES, F.; STERN, S.; OLAFSON, R.W.; ZILBERSTEIN, D. Retooling *Leishmania* metabolism: from sand fly gut to human macrophage. *The FASEB Journal*, v.22, 2008.

Götz, S. "B2G-FAR, a species centered GO annotation repository", *Bioinformatics*, Vol. 27 (7), 2011, pp. 919-924.

Götz, S. "High-throughput functional annotation and data mining with the Blast2GO suite", *Nucleic Acids Research*, Vol. 36, June, 2008, pp. 3420-3435.

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.

SAJID, M.; MCKERROW, J.H. Cysteine proteases of parasitic organisms. *Mol Biochem Parasitol*, v.120, p.1–21, 2001.

SCHLAGENHAUF, E.; ETGES, R.; METCALF, P. The crystal structure of the *Leishmania major* surface proteinase leishmanolysin (gp63). *Structure*, v.6, p.1035–1046, 1998.

SHALEV, M.; ROZENBERG, H.; SMOLKIN, B.; NASEREDDIN, A.; KOPELYANSKIY, D.; BELAKHOV, V.; SCHREPFER, T.; SCHACHT, J.; JAFFE, C.; ADIR, N.; BAASOV, T. Structural basis for selective targeting of *Leishmanial* ribosomes: aminoglycoside derivatives as promising therapeutics. *Nucleic Acids Research*. v.43, n.17, 2015.

SILVA-ALMEIDA, M.; PEREIRA, B.A.; ALVES, C.R. Proteinases as virulence factors in *Leishmania* spp. infection in mammals. *Parasites & Vectors*, v.5, n.160, 2012.

SILVEIRA, F; LAISON, R; CORBETT, C. Clinical and Immunopathological Spectrum of American Cutaneous *Leishmaniasis* with Special Reference to the Disease in Amazonian Brazil - A Review. Mem Inst Oswaldo Cruz, v. 99, p. 239-251, 2004.

SILVERMAN, J.M.; CHAN, S.K.; ROBINSON, D.P.; DWYER, D.M.; Proteomic analysis of the secretome of *Leishmania donovani*. Genome Biol, v.9, 2008.

SINCLAIR, J.; METODIEVA, G.; DAFOU, D.; GAYTHER, A.; TIMMS, J. F.; Profiling signatures of ovarian cancer tumour suppression using 2D-DIGE and 2D-LC-MS/MS with tandem mass tagging. Journal of Proteomics. v. 74, 2011.

SKLARCZYK D, FRANCESCHINI A, WYDER S, FORSLUND K, HELLER D, HUERTA-CEPAS J, SIMONOVIC M, ROTH A, SANTOS A, TSAFOU KP, KUHN M, BORK P, JENSEN LJ, VON MERINGC. STRING v10: protein-protein interaction networks, integrated over the tree of life. Nucleic Acids Res. 2015 Jan;43(Database issue):D447-52.

SOMANNA, A.; MUNDODI, V.; GEDAMU, L. Functional analysis of cathepsin B-like cysteine proteases from *Leishmania donovani* complex. Evidence for the activation of latent transforming growth factor beta. J Biol Chem, v.277, p. 25305–25312, 2002.

SOUZA, C.M. As leishmanioses no município de Belo Horizonte: estudos entomológicos e biogeográficos visando à vigilância epidemiológica [Tese de doutorado]. Belo Horizonte: Instituto Oswaldo Cruz; 2005.

SPATH, G.F.; GARRAWAY, L.A.; TURCO, S.J.; BEVERLEY, S.M. The role(s) of lipophosphoglycan (LPG) in the establishment of *Leishmania* major infections in mammalian hosts. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v.100, p.9536-9541, 2003.

STEBECK, C.E.; BEECROFT, R.P.; SINGH, B.N.; JARDIM, A.; OLAFSON, R.W.; TUCKEY, C.; PRENEVOST, K.D.; PEARSON, T.W. Kinetoplastid membrane protein-11 (KMP-11) is differentially expressed during the life cycle of African trypanosomes and is found in a wide variety of kinetoplastid parasites. Mol Biochem Parasitol, v.71, p.1-13, 1995

STUART, K.; BRUN, R.; CROFT, S.; TARLETON, R. Kinetoplastids: related protozoan pathogens, different diseases. *The Journal of Clinical Investigation*, v.118, n.4, 2008.

SURESH, S. Proteomic resources: integrating biomedical information in humans. *Gene*, v.364, p.13-18, 2005.

SVÁROVSKÁ, A.; ANT, TH.; SEBLOVÁ, V.; JECNÁ, L.; BEVERLEY, S.M.; VOLF, P. *Leishmania* major glycosylation mutants require phosphoglycans (lpg2-) but not lipophosphoglycan (lpg1-) for survival in permissive sand fly vectors. *PLoS Negl Trop Dis*, v.4, n.580, 2010.

SWENERTON, RK, ZHANG, S, SAJID, M, MEDZIHRADSKY, KF, CRAIK, CS, KELLY, BL, MCKERROW, JH. The oligopeptidase B of *Leishmania* regulates parasite enolase and immune evasion. *J Biol Chem*. v.286, p.429-40, 2011.

TAFURI, W.L.; SANTOS, R.L.; ARANTES, R.M.; GONÇALVES, R.; DE MELO, M.N.; MICHALICK, M.S.; TAFURI, W.L. An alternative immunohistochemical method for detecting *Leishmania* amastigotes in paraffin-embedded canine tissues. *J Immunol Methods*, v.292, p.17-23. 2004.

TANAKA, K.; WAKI, H.; IDO, Y. Protein and polymer analyses up to m/z 100 000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom*, v.8 p.151–3, 1988.

ÜNLÜ, M.; MORGAN, M.W.; MINDEN, J.S. Difference gel electrophoresis: a single gel method for detecting changes in protein extracts. *Electrophoresis*. v.18, p. 2071–2077, 1997

VANEGAS, G.; QUIÑONES, W.; CONCEPCIÓN, L.; AVILÁN, L. Enolase as a plasminogen binding protein in *Leishmania mexicana*. *Parasitol Res*, v.101, p.1511–1516, 2007.

VERGNES B, GOURBAL B, GIRARD I, SUNDAR S, DRUMMELSMITH J, OUELLETTE M. A proteomics screen implicates HSP83 and a small kinetoplastid calpain-related protein in drug resistance in *Leishmania donovani* clinical field isolates by modulating drug-induced programmed cell death. *Mol Cell Proteomics*, v.6, p. 88–101, 2007.

VERMELHO, A.B.; BRANQUINHA, M.H.; D'ÁVILA-LEVY, C.M.; SANTOS, A.L.S.; DIAS, E.P.S.; MELO, A.C.N. Biological Roles of Peptidases in Trypanosomatids. Open Parasitol J, v.4, p.5–23, 2010.

VICKERS, T.J.; WYLIE, S.H.; FAIRLAMB, A.H. *Leishmania* major elongation factor 1B complex has trypanothioneS-transferase and peroxidase activity. J Biol Chem, v.279, 2004.

VISWANATHAN, S.; UNLÜ, M.; MINDEN, J.S. Two-dimensional difference gel electrophoresis. Nat Protoc. v.1, p.1351-8, 2006.

WALKER, J.; ACESTOR, N.; GONGORA, R.; QUADRONI, M.; SEGURA, I.; FASEL, N. Comparative protein profiling identifies elongation factor-1beta and trypanothione peroxidase as factors associated with metastasis in *Leishmania guyanensis*. Mol Biochem Parasitol, v.145, p.254–64, 2006.

WALKER, J.; VASQUEZ, J.J.; GOMEZ, M.A. Identification of developmentally-regulated proteins in *Leishmania panamensis* by proteome profiling of promastigotes and axenic amastigotes. Mol Biochem Parasitol, v.147, p.64–73, 2006.

WESTERMEIER, R.; MAROUGA, R. Protein Detection methods in proteomics research. Biosci.Rep, v.25, p.19-32, 2005.

WESTMAN, J.; TAHERZADEH, M.; FRANZÉN, C. J. Proteomic Analysis of the Increased Stress Tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* Encapsulated in Liquid Core Alginate-Chitosan Capsules. Plos one. v.7, 2012.

WILKINS, M.R.; PASQUALI, C. From proteins to proteomes: Large scale protein identification by two-dimensional electrophoresis and amino acid analysis. Biotechnology, v.14, p.61-66, 1996.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Magnitude of the problem. Disponível em: <who.int/Leishmaniasis/burden/magnitude/burden_magnitude/en/index.html>. Acesso em: 30 set. 2009.

WYLLIE, S.; VICKERS, T.J.; FAIRLAMB, A.H. Roles of trypanothioneS-transferase and tryparedoxin peroxidase in resistance to antimonials. *Antimicrob Agents Chemother*; v.52, p.1359–65, 2008.

XIAO, S; WANG, Q, JIA, J; CHEN, Y. Proteome changes of lungs artificially infected with H-PRRSV and N-PRRSV by two-dimensional fluorescence difference gel electrophoresis. *Virology Journal*, v.7, 2010.

XIE, J.; TECHRITZ, S.; HAEBEL, S.; HORN, A. A two-dimensional electrophoretic map of humanmitochondrial proteins from immortalized lymphoblastoid cell lines: a prerequisite to studymitochondrial disorders in patients. *Proteomics*, v.5, p.2981–2999, 2005.

YAO, C. Major Surface Protease of Trypanosomatids: One Size Fits All? *Infect Immun*, v.78, p.22–31, 2010.

YAO, C.; DONELSON, J.E. Internal and Surface-Localized Major Surface Proteases of *Leishmania* spp. and Their Differential Release from Promastigote. *Eukaryotic Cell*, v.6, p.1905–1912, 2007.

YAO, C.; DONELSON, J.E.; WILSON, M.E. The major surface protease (MSP or GP63) of *Leishmania* sp. Biosynthesis, regulation of expression, and function. *Mol Biochem Parasitol*, v.132, p.1–16, 2003.

YAO, C.; LUO, J.; STORLIE, P.; DONELSON, J.E. Multiples products of the *Leishmania* chagasi major surface protease (MSP or GP63) gene family. *Molecular & Biochemical Parasitology*, v.135, p.171-183, 2004.

ZAMORA-VEYL, F.B.; KROEMER, M.; ZANDER, D.; CLOS, J. Stage-specific expression of the mitochondrial co-chaperonin of *Leishmania* donovani, CPN10. *Kinetoplastid Biology and Disease* v.4, n.3, 2005.

ZHANG, W.W.; PEACOCK, C.S.; MATLASHEWSKI, G. A genomic-based approach combining in vivo selection in mice to identify a novel virulence gene in *Leishmania*. *Plos Neglected tropical diseases*, v.2, e248. 2008.

ZUFFEREY, R.; ALLEN, S.; BARRON, T.; SULLIVAN, D.R.; DENNY, P.W.; ALMEIDA, I.C.; SMITH, D.F.; TURCO, S.J.; FERGUSON, M.A.; BEVERLEY, S.M. Ether hospholipids and glycosylinositolphospholipids are not required for amastigote virulence or for inhibition of macrophage activation by *Leishmania major*. J Biol Chem, v.278, p.44708–44718, 2003.

9 APÊNDICES

Apêndice 1: Lista de proteínas identificadas com diferença de abundância na forma Promastigota. Valores de Fold Change (< 0,5: diminuído; > 2,0: aumentado; - sem alteração); Gene da proteína; Número Identificador no banco de dados NCBI; técnica quantitativa onde foram encontradas (T = TMT e D = DIGE).

Proteína	Fold Change		Gene	Identificador (NCBI)	DIGE / TMT
	BH46	BH400			
1,2-Dihydroxy-3-keto-5-methylthiopentene dioxygenase	-	0,3	LinJ.20.0980	XP_001465230.1	T
10 kDa heat shock protein	3,54	10,24	LinJ.26.0610	XP_001470407.1	T
14-3-3 protein-like protein	0,5	2,05	LinJ.36.3360	XP_001469728.1	D*
2,3-bisphosphoglycerate-independent phosphoglycerate mutase	2,87	-	LinJ.36.6960	XP_003392848.1	T*
2,3-bisphosphoglycerate-independent phosphoglycerate mutase	3,94	0,40	LinJ.36.6960	XP_003392848.1	D*
2,4-dihydroxyhept-2-ene-1,7-dioic acid aldolase	0,22	9	LinJ.25.2090	XP_001466240.1	D
20S proteasome subunit alpha 5	0,45	0,37	LinJ.21.2200	XP_001465480.1	T
2-oxoglutarate dehydrogenase, E2 component, dihydrolipoamide succinyltransferase	0,17	0,07	LinJ.28.2600	XP_001470285.1	T
3,2-trans-enoyl-CoA isomerase, mitochondrial precursor	3,68	0,42	LinJ.31.2320	XP_001467527.1	D*
3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase	0,32	0,25	LinJ.30.3230	XP_001467171.1	T
3-hydroxyisobutyryl-coenzyme A hydrolase-like protein	0,37	-	LinJ.32.3810	XP_001468053.1	D
3-ketoacyl-CoA thiolase	-	0,45	LinJ.23.0860	XP_003860986.1	T
40S ribosomal protein S12	-	2,04	LinJ.13.0460	XP_001464077.1	T*
40S ribosomal protein S12	-	13,38	LinJ.13.0460	XP_001464077.1	D*
40S ribosomal protein S15	3,67	12,54	LinJ.22.0340	XP_001465565.1	T
40S ribosomal protein S18	-	3,79	LinJ.36.0990	XP_001469510.1	T
40S ribosomal protein S2	-	3,62	LinJ.19.0050	XP_003392409.1	T
40S ribosomal protein S21	-	11,96	LinJ.11.0780	XP_001463878.1	T
40S ribosomal protein S23	-	0,43	LinJ.21.1300	XP_003392475.1	T
40S ribosomal protein S24e	5,89	-	LinJ.36.3020	XP_001469694.1	T
40S ribosomal protein S27-1	-	10,04	LinJ.36.3940	XP_001469640.1	T
40S ribosomal protein S3	0,3	-	LinJ.33.0960	XP_001468174.1	T
40S ribosomal protein S33	-	14,07	LinJ.26.1610	XP_001470507.1	T
40S ribosomal protein S3A	0,48	-	LinJ.35.0400	XP_001468859.1	T
40S ribosomal protein S5	-	8,01	LinJ.11.0960	XP_001463896.1	T
40S ribosomal protein S6	-	3,06	LinJ.35.2000	XP_001469018.1	T
40S ribosomal protein S9	0,5	0,26	LinJ.36.1310	XP_001469478.1	T
40S ribosomal protein SA	0,26	0,49	LinJ.36.5350	XP_001469903.1	T
4-methyl-5(beta-hydroxyethyl)-thiazole monophosphate synthesis protein	12,19	14,03	LinJ.30.0800	XP_001466925.1	T

60S acidic ribosomal protein P2	6,02	3,55	LinJ.30.3780	XP_001467168.1	T
60S acidic ribosomal subunit protein	2,04	14,02	LinJ.27.1300	XP_001466374.1	T*
60S ribosomal protein L10	0,45	0,41	LinJ.04.0750	XP_001462913.1	T
60S ribosomal protein L13	-	3,87	LinJ.29.2570	XP_001466779.1	T
60S ribosomal protein L13a	-	0,47	LinJ.34.0910	XP_001468462.1	T
60S ribosomal protein L18	-	5,97	LinJ.13.0450	XP_001464076.1	T
60S ribosomal protein L19	-	7,88	LinJ.06.0410	XP_001463122.1	T
60S ribosomal protein L22	0,25	0,32	LinJ.36.4640	XP_001469840.1	T
60S ribosomal protein L23	-	5,96	LinJ.35.3840	XP_001469187.1	T
60S ribosomal protein L27A/L29	-	14,12	LinJ.35.3830	XP_001469186.1	T
60S ribosomal protein L28	-	5,92	LinJ.11.1110	XP_001463910.1	T
60S ribosomal protein L32	-	19,77	LinJ.35.2040	XP_001469022.1	T
60S ribosomal protein L34	-	0,39	LinJ.18.1380	XP_001464951.1	T
60S Ribosomal protein L36	2,11	17,14	LinJ.21.0800	XP_001465385.1	T
60S ribosomal protein L37	0,41	0,45	LinJ.33.2070	XP_003392739.1	T
60S ribosomal protein L5	-	3,68	LinJ.35.1880	XP_001469007.1	T
60S ribosomal protein L6	-	3,61	LinJ.33.0770	XP_001468157.1	T
activated protein kinase c receptor (LACK)	2,61	-	LinJ.28.2940	XP_001470319.2	D*
activated protein kinase c receptor (LACK)	-	5,77	LinJ.28.2940	XP_001470319.2	T*
adenosine kinase	-	0,32	LinJ.30.0940	XP_001466939.1	T
ADF/Cofilin	3,98	2,01	LinJ.29.0520	XP_001466572.1	T*
ADP,ATP carrier protein 1, mitochondrial precursor,ADP/ATP translocase 1	0,48	0,19	LinJ.19.0200	XP_001464984.1	T
ADP-ribosylation factor	0,22	0,03	LinJ.31.2890	XP_001467603.1	T
aldose 1-epimerase	0,5	0,26	LinJ.35.0990	XP_001468913.1	T
ATP synthase F1 subunit gamma protein	0,27	0,26	LinJ.21.2140	XP_001465474.1	T
ATP synthase, epsilon chain	0,43	-	LinJ.30.3660	XP_001467220.1	T
ATPase alpha subunit	-	0,47	LinJ.05.0500	XP_001463013.2	T
ATPase beta subunit	0,27	0,27	LinJ.25.2590	XP_003888459.1	T
ATPase beta subunit	0,44	0,45	LinJ.25.1210	XP_001466152.1	T
ATP-dependent DEAD/H RNA helicase	-	0,35	LinJ.07.0130	XP_001463224.1	T
ATP-dependent phosphofructokinase	-	0,43	LinJ.29.2620	XP_001466784.1	T
ATP-dependent RNA helicase	7,3	0,24	LinJ.35.3150	XP_001469120.1	D
calmodulin	3,79	-	LinJ.09.0980	XP_001463555.1	T
calpain-like cysteine peptidase	2	9,85	LinJ.14.0920	XP_001464271.1	T
calpain-like cysteine peptidase	-	0,49	LinJ.20.1210	XP_001465252.2	T
calpain-like cysteine peptidase, Clan CA, family C2	-	2,08	LinJ.20.1320	XP_001465262.1	T
calreticulin	0,47	-	LinJ.31.2670	XP_001467584.1	D*
citrate synthase	-	0,29	LinJ.18.0690	XP_001464885.1	T
cofilin-like protein	0,21	6,2	LinJ.29.0520	XP_001466572.1	D
conserved hypothetical protein Lbrm.29.2740	8,42	0,18	Lbrm.29.2740	CAM40130.1	D
conserved hypothetical protein Lbrm.34.0220	-	0,09	Lbrm_34_0220	CAM43239.1	D
conserved hypothetical protein Lbrm.35.3530	-	22,1	Lbrm.35.3530	CAM44105.1	D
conserved hypothetical protein LinJ.02.0430	-	0,44	LinJ.02.0430	XP_001462734.1	T

conserved hypothetical protein LinJ.04.0400	0,48	-	LinJ.04.0400	XP_001462878.1	D
conserved hypothetical protein LinJ.05.0450	3,77	-	LinJ.05.0450	XP_001463008.1	D
conserved hypothetical protein LinJ.06.0030	-	0,42	LinJ.06.0030	XP_001463087.1	T
conserved hypothetical protein LinJ.08.1010	-	3,97	LinJ.08.1010	XP_001463434.1	T
conserved hypothetical protein LinJ.10.1420	-	8,67	LinJ.10.1420	XP_001463784.1	D
conserved hypothetical protein LinJ.11.0820	0,5	-	LinJ.11.0820	XP_001463882.1	T
conserved hypothetical protein LinJ.13.0270	3,78	5,78	LinJ.13.0270	XP_001464059.1	T
conserved hypothetical protein LinJ.14.0190	-	14,02	LinJ.14.0190	XP_001464202.1	T
conserved hypothetical protein LinJ.14.0240	-	17,56	LinJ.14.0240	XP_001464207.1	T
conserved hypothetical protein LinJ.14.0460	0,49	-	LinJ.14.0460	XP_001464229.1	T
conserved hypothetical protein LinJ.15.1170	0,31	0,35	LinJ.15.1170	XP_003392371.1	T
conserved hypothetical protein LinJ.16.1500	-	11,92	LinJ.16.1500	XP_001464629.1	T
conserved hypothetical protein LinJ.18.0210	-	0,4	LinJ.18.0210	XP_001464838.1	T
conserved hypothetical protein LinJ.18.1640	2,46	0,48	LinJ.18.1640	XP_001464976.1	D
conserved hypothetical protein LinJ.21.0440	0,33	0,26	LinJ.21.0440	XP_001465349.1	T
conserved hypothetical protein LinJ.23.0810	0,48	0,38	LinJ.23.0810	XP_001465756.1	T
conserved hypothetical protein LinJ.24.2200	-	0,38	LinJ.24.2200	XP_001466011.1	T
conserved hypothetical protein LinJ.25.0160	0,21	6,2	LinJ.25.0160	XP_001466049.1	D
conserved hypothetical protein LinJ.25.1100	0,45	-	LinJ.25.1100	XP_001466139.1	T
conserved hypothetical protein LinJ.26.1080	-	4	LinJ.26.1080	XP_001470450.1	T
conserved hypothetical protein LinJ.27.1100	0,46	0,39	LinJ.27.1100	XP_001466355.1	D
conserved hypothetical protein LinJ.27.1220	-	2,06	LinJ.27.1220	XP_001466366.1	T
conserved hypothetical protein LinJ.27.1920	0,26	0,33	LinJ.27.1920	XP_001466440.1	T
conserved hypothetical protein LinJ.28.1830	0,02	0,01	LinJ.28.1830	XP_001470210.1	T
conserved hypothetical protein LinJ.29.0170	-	2,2	LinJ.29.0170	XP_001466522.1	T
conserved hypothetical protein LinJ.29.0940	-	0,22	LinJ.29.0940	XP_001466612.1	T
conserved hypothetical protein LinJ.30.3360	-	3,78	LinJ.30.3360	XP_001467184.1	T
conserved hypothetical protein LinJ.30.3740	0,45	0,43	LinJ.30.3740	XP_001467228.1	T
conserved hypothetical protein LinJ.31.1440	0,37	0,2	LinJ.31.1440	XP_001467437.1	T
conserved hypothetical protein LinJ.32.2330	0,52	11,05	LinJ.32.2330	XP_001467910.1	D
conserved hypothetical protein LinJ.32.2410	0,38	-	LinJ.32.2410	XP_001467918.1	T
conserved hypothetical protein LinJ.32.3000	-	0,37	LinJ.32.3000	XP_001467976.1	T
conserved hypothetical protein LinJ.33.2940	0,32	0,3	LinJ.33.2940	XP_001468340.1	T
conserved hypothetical protein LinJ.34.0710	0,46	0,41	LinJ.34.0710	XP_001468458.2	T
conserved hypothetical protein LinJ.34.0720	0,46	0,41	LinJ.34.0720	XP_001468807.2	T
conserved hypothetical protein LinJ.34.1620	5,74	-	LinJ.34.1620	XP_001468533.1	T
conserved hypothetical protein LinJ.34.1630	5,74	-	LinJ.34.1630	XP_001468534.1	T
conserved hypothetical protein LinJ.34.3590	-	2,02	LinJ.34.3590	XP_001468716.1	T
conserved hypothetical protein LinJ.35.0180	0,46	-	LinJ.35.0180	XP_001468838.1	D
conserved hypothetical protein LinJ.35.3770	0,49	-	LinJ.35.3770	XP_001469180.1	T
conserved hypothetical protein LinJ.35.4450	-	3,61	LinJ.35.4450	XP_001469247.1	T
conserved hypothetical protein LinJ.36.0510	3,69	-	LinJ.36.0510	XP_001469558.1	D
conserved hypothetical protein LinJ.36.3780	0,47	-	LinJ.36.3780	XP_001469656.1	T
conserved hypothetical protein LinJ.36.5330	2,03	13,92	LinJ.36.5330	XP_001469901.1	T
conserved hypothetical protein LinJ.36.6110	-	2,88	LinJ.36.6110	XP_001469967.1	T

conserved hypothetical protein LinJ.36.7070	-	5,75	LinJ.36.7070	XP_001469385.1	T
conserved hypothetical protein LmJf.34.1360	0,28	-	LmJf.34.1360	CAJ07846.1	D
conserved hypothetical protein Lmxm.17.0990	2,46	0,48	Lmxm.17.0990	CBZ25458.1	D
conserved hypothetical protein Tb10.70.1640	-	0,43	Tb10.70.1640	EAN77957.1	D
conserved hypothetical protein Tb11.01.3290	0,002	0,44	Tb11.01.3290	EAN80099.1	D
conserved hypothetical protein Tb11.01.8680	-	13,38	Tb11.01.8680	EAN80635.1	D
cyclophilin 2	-	0,47	LinJ.06.0120	XP_001463094.1	T
cyclophilin a	-	3,93	LinJ.25.0940	XP_001466123.1	T
cystathione gamma lyase	-	0,5	LinJ.35.3280	XP_001469133.1	T
cytochrome c	13,41	9,84	LinJ.16.1390	XP_001464620.1	T
cytochrome c oxidase subunit IV	-	2,45	LinJ.12.0620	XP_003392306.1	T
cytochrome c oxidase subunit V	0,44	-	LinJ.26.1690	XP_001470514.1	T
cytoskeleton-associated protein CAP5.5,cysteine peptidase, Clan CA, family C2	-	0,46	LinJ.31.0450	XP_001467313.1	T
dihydrolipoamide acetyltransferase precursor	0,48	-	LinJ.36.2790	XP_001469441.1	D
dihydrolipoamide dehydrogenase	-	3,5	LinJ.32.3510	XP_001468025.1	T
d-isomer specific 2-hydroxyacid dehydrogenase- protein	0,49	0,33	LinJ.34.1510	XP_001468522.2	T
d-isomer specific 2-hydroxyacid dehydrogenase- protein	-	0,25	LinJ.34.4360	XP_001468792.1	T
elongation factor 1-alpha	-	0,45	LinJ.17.0090	XP_001464664.1	D
elongation factor 1-beta	-	4,97	LmxM.33.0820	CBZ30222.1	D
elongation factor 1-gamma	0,47	-	LinJ.09.1020	XP_001463559.1	T
elongation factor 1-gamma	0,46	0,18	LinJ.33.1630	XP_001468244.1	T
elongation factor 2	-	10,47	LinJ.36.0190	XP_001469588.1	D*
elongation factor 2	-	2,4	LinJ.36.0190	XP_001469588.1	T*
endoribonuclease L-PSP (pb5)	0,06	49,18	LinJ.23.0220	XP_001465699.1	D
Enolase	7,25	6,27	LinJ.14.1240	XP_001464303.1	T
eukaryotic initiation factor 4a	0,48	2,2	LinJ.01.0800	XP_001462693.1	T
eukaryotic initiation factor 5a	-	3,67	LinJ.25.0760	XP_001466106.1	T
eukaryotic translation initiation factor 3 subunit	0,08	22,1	LinJ.36.4070	XP_001469627.1	D*
eukaryotic translation initiation factor 3 subunit	0,45	-	LinJ.36.4070	XP_001469627.1	T*
eukaryotic translation initiation factor 3 subunit 7-like protein	3,91	11,75	LinJ.30.3080	XP_001467154.1	T
eukaryotic translation initiation factor 6 (eIF-6)	0,34	3,96	LinJ.36.0950	XP_001469514.1	D
fatty acid elongase	0,32	-	LinJ.14.0700	XP_001464251.1	T
fructose-1,6-bisphosphate aldolase	0,45	-	LinJ.36.1320	XP_001469477.1	D*
fructose-1,6-bisphosphate aldolase	-	0,38	LinJ.36.1320	XP_001469477.1	T*
galactokinase-like protein	-	3,7	LinJ.35.2790	XP_001469061.1	T
GDP-mannose pyrophosphorylase	-	0,27	LinJ.23.0120	XP_001465689.1	T*
glucose transporter, lmg1	-	5,91	LinJ.36.6560	XP_001469352.2	T
glucose transporter, lmg2	-	5,91	LinJ.36.6550	XP_001469343.1	T
glucose transporter, lmg3	-	5,91	LinJ.36.6540	XP_003392839.1	T
glucose-regulated protein 78	0,43	0,46	LinJ.28.1310	XP_001470161.1	D*
glutamine synthetase	0,71	2,01	LinJ.06.0370	XP_001463119.1	D
glutathione peroxidase-like protein	3,99	-	LinJ.26.0770	XP_001470422.1	T
glycosomal malate dehydrogenase	0,19	0,08	LinJ.19.0710	XP_001465032.1	T

glycosomal membrane protein	-	0,32	LinJ.28.2430	XP_001470269.1	T
glycosomal phosphoenolpyruvate carboxykinase	0,44	-	LinJ.27.1710	XP_001466420.1	T*
GP63, leishmanolysin	3,88	0,45	LinJ.10.0490	XP_001463699.2	T
GP63, leishmanolysin	3,61	0,4	LinJ.10.0520	XP_001463701.2	T
GTP binding protein	0,18	0,17	LinJ.27.2260	XP_001466463.1	T
GTP-binding protein Rab1	0,50	32,78	LinJ.27.0620	XP_003392649.1	D
heat shock 70-related protein 1, mitochondrial precursor	-	0,46	LinJ.30.2470	XP_001467093.1	T
heat shock protein 70	-	0,19	LinJ.28.2960	XP_001470324.1	D
heat shock protein DNAJ	0,44	0,26	LinJ.27.2350	XP_001466474.1	T
hexokinase	0,5	-	LinJ.21.0300	XP_001465335.1	T
histone H1	7,91	-	LinJ.27.1070	XP_001466353.1	T
histone H2A	2,01	-	LinJ.21.1160	XP_003392461.1	T
histone H3	-	0,29	LinJ.19.0630	XP_001465025.1	T
histone H3 variant	-	0,28	LinJ.19.0630	XP_001465025.1	T
histone H4	0,31	0,17	LinJ.21.0020	XP_001465510.1	T
HslVU complex proteolytic subunit	0,44	-	LinJ.36.4180	XP_001469616.1	D
hypothetical protein LinJ.02.0520	3,95	-	LinJ.02.0520	XP_001462742.1	T
hypothetical protein LinJ.08.0650	0,12	0,07	LinJ.08.0650	XP_001463403.1	T
hypothetical protein LinJ.15.0730	0,12	0,14	LinJ.15.0730	XP_003392369.1	T
hypothetical protein LinJ.30.1140	0,04	0,04	LinJ.30.1140	XP_001466958.1	T
hypothetical protein LinJ.31.1050	0,4	-	LinJ.31.1050	XP_001467398.1	T
hypothetical protein SCD6.10	3,75	-	LinJ.25.0550	XP_001466086.1	T
hypothetical protein Tb927.7.980	0,09	0,28	Tb927.7.980	XP_845722.1	D
hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase	-	0,42	LinJ.21.0980	XP_003392447.1	T
i/6 autoantigen-like protein	0,49	-	LinJ.22.1310	XP_001465646.1	D
IgE-dependent histamine-releasing factor	11,64	-	LinJ.22.1310	XP_001465646.1	D*
IgE-dependent histamine-releasing factor	-	2,86	LinJ.24.1560	XP_001465979.1	T*
iron superoxide dismutase	2,04	-	LinJ.32.1920	XP_001467867.1	T
isocitrate dehydrogenase [NADP], mitochondrial precursor	0,25	0,4	LinJ.10.0310	XP_001463680.1	T
kinesin	6,3	5,6	LinJ.16.1550	XP_001464634.2	T
kinesin	7,4	49,42	LinJ.11.0870	XP_001463887.1	D
kinesin K39	-	0,45	LinJ.14.1190	XP_001464299.2	T
kinetoplast-associated protein-like protein	14,21	-	LinJ.27.0250	XP_001466296.1	T
kinetoplastid membrane protein-11	5,47	9,67	LinJ.35.2250	XP_001469031.1	T
la RNA binding protein	-	2,96	LinJ.21.0600	XP_001465365.1	T
lysyl-tRNA synthetase	0,18	0,2	LinJ.15.0270	XP_001464365.1	T
malate dehydrogenase	0,08	0,08	LinJ.34.0140	XP_001468401.2	T
MAP kinase	0,09	0,03	LinJ.33.1470	XP_001468229.1	T
metallo-peptidase, Clan MA(E), Family 32	2	20,58	LinJ.13.0090	XP_001464036.1	T
metallo-peptidase, Clan MA(E), Family M32	3,59	-	LinJ.33.2670	XP_001468312.1	T
metallo-peptidase, Clan MF, Family M17	3,93	3,56	LinJ.11.0630	XP_001463863.1	T
microtubule-associated protein	-	5,83	LinJ.05.0380	XP_001463001.1	T

mitochondrial associated ribonuclease	2,02	0,31	LinJ.08.0330	XP_001463374.1	T
mitochondrial malate dehydrogenase	0,41	0,09	LinJ.34.0170	XP_001468404.1	T
mitochondrial processing peptidase alpha subunit,metallo-peptidase, Clan ME, Family M16	2,98	-	LinJ.21.0400	XP_001465345.1	T
mitochondrial processing peptidase alpha subunit,metallo-peptidase, Clan ME, Family M16	-	0,29	LinJ.13.0760	XP_001464106.1	T
mitochondrial RNA binding protein 1, MRP1, gBP21	3,99	3,05	LinJ.27.0980	XP_001466345.1	T
mitochondrial RNA binding protein 2, MRP2, gBP25	-	0,17	LinJ.09.1180	XP_001463575.1	T
NADH-cytochrome b5 reductase	-	2,85	LinJ.13.0960	XP_001464125.1	T
NADH-dependent fumarate reductase protein	0,47	0,27	LinJ.35.0850	XP_001468899.1	T
NADP-dependent alcohol dehydrogenase	-	5,73	LinJ.23.0410	XP_001465717.1	T
nucleosome assembly protein-like protein	-	3,82	LinJ.31.1770	XP_001467471.1	T
orotidine-5-phosphate decarboxylase/orotate phosphoribosyltransferase,OMPDCase-OPRTase	-	0,46	LinJ.16.0560	XP_001464543.1	T
oxidoreductase	-	0,5	LinJ.36.4380	XP_001470025.1	T
paraflagellar rod protein 1D	2,06	-	LinJ.29.1880	XP_003392693.1	T*
paraflagellar rod protein 1D	-	2,64	LinJ.29.1880	XP_003392693.1	D*
peptidylprolyl isomerase-like protein histone H2A	0,19	0,14	LinJ.19.1560	XP_001465122.1	T
peroxidoxin	7,63	24,32	LinJ.23.0050	XP_001465682.1	D
phosphoglycerate kinase C, glycosomal	2	-	LinJ.20.0110	XP_003392440.1	T
phosphomannomutase	0,49	11,05	LinJ.36.2070	XP_001469787.1	D
prostaglandin f2-alpha synthase/D-arabinose dehydrogenase	-	2,03	LinJ.31.2210	XP_001467513.1	T
proteasome alpha 1 subunit	0,23	23,48	LinJ.35.4910	XP_001469290.1	D
proteasome alpha 2 subunit	2,62	4,98	LinJ.21.2070	XP_001465467.1	D
proteasome alpha 3 subunit	-	5,13	LinJ.14.0310	XP_001464214.1	D
proteasome alpha 5 subunit	0,52	11,05	LinJ.21.2200	XP_001465480.1	D
proteasome alpha 7 subunit	2,01	3,06	LinJ.11.0240	XP_001463827.1	T
proteasome beta 3 subunit	0,44	-	LinJ.28.0110	XP_001470046.1	D
proteasome regulatory non-ATP-ase subunit	-	4,7	LinJ.32.1260	XP_001467806.1	D
protein disulfide isomerase	0,45	0,21	LinJ.36.7280	XP_001469404.1	D
protein disulfide isomerase	3,02	0,45	LinJ.06.1090	XP_001463188.1	T
protein tyrosine phosphatase-like protein	2,02	-	LinJ.16.0240	XP_001464513.1	T
P-type H -ATPase	-	2,04	LinJ.18.1510	XP_001464964.2	T
pyrroline-5-carboxylate reductase	0,44	-	LinJ.13.1420	XP_003392356.1	T
pyruvate dehydrogenase E1 beta subunit	5,43	0,33	LinJ.25.1790	XP_001466210.1	T*
pyruvate dehydrogenase E1 component alpha subunit	0,18	0,26	LinJ.18.1360	XP_001464949.1	T
pyruvate kinase	3,75	2,05	LinJ.35.5450	XP_001468820.1	T*
pyruvate phosphate dikinase	0,44	-	LinJ.11.1000	XP_001463900.2	T
rab1 small GTP-binding protein	0,44	0,25	LinJ.10.1250	XP_001463769.1	T
rab7 GTP binding protein	0,34	0,23	LinJ.18.0890	XP_003392405.1	T
ras-related rab-4	0,44	0,25	LinJ.32.0520	XP_001467752.1	T
reiske iron-sulfur protein precursor	0,48	2,37	LinJ.35.1540	XP_001468974.2	D
replication factor A, 51kDa subunit	0,49	-	LinJ.28.1940	XP_001470220.1	D
reticulon domain protein, 22 kDa potentially aggravating protein (paple22)	-	3,79	LinJ.30.2570	XP_001467102.1	T
ribonucleoprotein p18, mitochondrial precursor	2,24	0,38	LinJ.15.0330	XP_001464371.1	T

ribosomal protein L24	-	0,47	LinJ.36.1160	XP_001469493.2	T
ribosomal protein L27	-	3,1	LinJ.32.2830	XP_001467959.1	T
ribosomal protein L3	-	3,92	LinJ.32.3320	XP_001468006.1	T
ribosomal protein S20	-	9,91	LinJ.28.1100	XP_003392671.1	T
ribosomal protein S25	0,32	0,35	LinJ.25.1220	XP_001466153.1	T
ribosomal protein S6,NPH2/RS6-like protein	-	0,33	LinJ.15.1530	XP_001464476.1	T
ribosomal protein S7	-	2,09	LinJ.01.0430	XP_001462656.1	T
RNA helicase	3,92	0,40	LinJ.21.1820	XP_001465449.1	D
RNA-binding protein	-	3,75	LinJ.04.1190	XP_001462957.1	T
RNA-binding protein	-	8,25	LinJ.32.0790	XP_001467761.1	T
RNA-binding protein, UPB1	2,93	-	LinJ.25.0500	XP_003392595.1	T
S-adenosylhomocysteine hydrolase	0,30	4,54	LinJ.36.4100	XP_001469624.1	D
S-adenosylhomocysteine hydrolase	8,88	9,05	LinJ.36.4100	XP_001469624.1	T*
S-adenosylmethionine synthetase	3,05	-	LinJ.30.3560	XP_003392704.1	D
Sequence 10 from patent US 7700121	0,48	0,40	-	ADL81659.1	D
Sequence 3 from patent US 7700121	3,68	3,88	-	ADL81652.1	D
Sequence 96 from patent US 6500437	0,42	0,21	-	AAO95731.1	D*
Sequence 96 from patent US 6500437	6,13	49,42	-	AAO95731.1	D*
serine/threonine-protein kinase,protein kinase	-	0,31	LinJ.29.2680	XP_001466789.1	T
small myristoylated protein-1	6,25	13,38	LinJ.20.1350	XP_001465265.1	D
soluble promastigote surface antigen PSA-38S	0,04	28,64	-	ACY70940.1	D
spermidine synthase	0,57	5,19	LinJ.04.0570	XP_001462895.1	D
splicing factor ptrs1-like protein	9,8	-	LinJ.07.1020	XP_001463304.1	T
sterol 24-c-methyltransferase	-	0,49	LinJ.36.2510	XP_001469831.1	T
stress-inducible protein STI1 homolog	2,03	17,24	LinJ.36.0080	XP_001469599.1	T
succinyl-CoA ligase [GDP-forming] beta-chain	5,15	-	LinJ.36.3100	XP_001469702.1	D*
Surface membrane glycoprotein GP46/M-2	0,04	28,64	-	P21978.1	D
transaldolase	7,99	4,05	LinJ.16.0760	XP_001464564.1	T
translation elongation factor 1-beta	0,39	0,39	LinJ.36.1490	XP_001469731.1	T
translation elongation factor 1-beta	4,68	11,48	LinJ.34.0890	XP_001468460.1	T*
translation elongation factor 1-beta	11,32	0,09	LinJ.34.0890	XP_001468460.1	D*
trypanin-like protein	0,02	0,01	LinJ.35.1800	XP_001469000.1	T
trypanothione reductase	0,21	6,32	LinJ.05.0350	XP_001462998.1	D*
trypanothione reductase	9,84	-	LinJ.05.0350	XP_001462998.1	T*
tryparedoxin	2,65	0,29	LinJ.29.1250	XP_001466642.1	T*
tryparedoxin	6,25	49,18	LinJ.29.1250	XP_001466642.1	D*
tryparedoxin peroxidase	7,63	19,43	LinJ.15.1140	XP_001464446.1	D*
tryparedoxin peroxidase	3,64	5,1	LinJ.15.1140	XP_001464446.1	T*
U3 small nucleolar ribonucleoprotein protein MPP10	13,23	0,09	LinJ.29.0780	XP_001466597.1	D

U3 snoRNA-associated protein UTP11	-	0,49	LmJf.19.0670	XP_001682644.1	D
UDP-glucose pyrophosphorylase	0,45	0,4	LinJ.18.0990	XP_001464913.1	T*
vacuolar ATP synthase subunit b	0,19	6,79	LinJ.28.2610	XP_001470286.1	D*
vacuolar ATP synthase subunit b	0,37	0,29	LinJ.28.2610	XP_001470286.1	T*
vacuolar-type proton translocating pyrophosphatase 1	-	0,44	LinJ.31.1240	XP_001467417.1	T

*As proteínas em negrito apresentaram resultados controversos entre as duas técnicas utilizadas, e foi observado que possuíam valores de massa molecular e ponto isoelétrico experimental diferente dos valores preditos em banco de dados (Apêndice 4).

Apêndice 2: Lista de proteínas identificadas com diferença de abundância na forma Amastigota Axênica. Valores de Fold Change (< 0,5: diminuído; > 2,0: aumentado; - sem alteração); Gene da proteína; Número Identificador no banco de dados NCBI; técnica quantitativa onde foram encontradas (T = TMT e D = DIGE).

Proteína	Fold Change		Gene	Identificador (NCBI)	DIGE / TMT
	BH46	BH400			
1,2-Dihydroxy-3-keto-5-methylthiopentene dioxygenase	-	0,47	LinJ.20.0980	XP_001465230.1	T
10 kDa heat shock protein	0,41	0,42	LinJ.26.0610	XP_001470407.1	T
14-3-3 protein-like protein	0,48	0,46	LinJ.36.3360	XP_001469728.1	T*
2,3-bisphosphoglycerate-independent phosphoglycerate mutase	13,09	0,47	LinJ.36.6960	XP_003392848.1	D*
2,3-bisphosphoglycerate-independent phosphoglycerate mutase	0,5	0,48	LinJ.36.6960	XP_003392848.1	T*
2,4-dihydroxyhept-2-ene-1,7-dioic acid aldolase	2,4	0,48	LinJ.25.2090	XP_001466240.1	D
20S proteasome subunit alpha 5	-	0,41	LinJ.21.2200	XP_001465480.1	T
2-oxoisovalerate dehydrogenase alpha subunit	2,68	0,47	LinJ.21.1670	XP_001465431.1	D
3,2-trans-enoyl-CoA isomerase, mitochondrial precursor	4,94	8,18	LinJ.31.2320	XP_001467527.1	D*
3-hydroxyisobutyryl-coenzyme a hydrolase-like protein	3,71	-	LinJ.32.3810	XP_001468053.1	D
40S ribosomal protein S11	-	2,06	LinJ.21.1790	XP_001465452.1	T
40S ribosomal protein S12	0,32	0,31	LinJ.13.0460	XP_001464077.1	T*
40S ribosomal protein S15	-	0,45	LinJ.22.0340	XP_001465565.1	T
40S ribosomal protein S17	-	0,43	LinJ.28.2750	XP_001470300.1	T
40S ribosomal protein S21	0,41	0,43	LinJ.11.0780	XP_001463878.1	T
40S ribosomal protein S27-1	0,25	0,25	LinJ.36.3940	XP_001469640.1	T
40S ribosomal protein S3	0,29	0,33	LinJ.33.0960	XP_001468174.1	T
40S ribosomal protein S33	0,28	0,31	LinJ.26.1610	XP_001470507.1	T
40S ribosomal protein S5	0,17	0,18	LinJ.11.0960	XP_001463896.1	T
40S ribosomal protein S8	0,44	-	LinJ.24.2160	XP_001466007.1	T
40S ribosomal protein S9	-	3,7	LinJ.36.1310	XP_001469478.1	T
40S ribosomal protein SA	0,26	0,4	LinJ.36.5350	XP_001469903.1	T
4-methyl-5(beta-hydroxyethyl)-thiazole monophosphate synthesis protein	0,3	0,41	LinJ.30.0800	XP_001466925.1	T
60S acidic ribosomal protein P2	0,23	0,22	LinJ.30.3780	XP_001467168.1	T
60S acidic ribosomal subunit protein	2,78	0,49	LinJ.27.1300	XP_001466374.1	D*
60S acidic ribosomal subunit protein	0,42	0,46	LinJ.27.1300	XP_001466374.1	T*
60S ribosomal protein L10	-	3,86	LinJ.04.0750	XP_001462913.1	T
60S ribosomal protein L11 (L5, L16)	-	3,54	LinJ.22.0004	XP_003392484.1	T
60S ribosomal protein L17	0,29	0,28	LinJ.24.0040	XP_001465868.1	T
60S ribosomal protein L18	0,42	-	LinJ.13.0450	XP_001464076.1	T
60S ribosomal protein L18a	0,47	-	LinJ.35.0600	XP_001468876.1	T
60S ribosomal protein L19	0,29	0,31	LinJ.06.0410	XP_001463122.1	T

60S ribosomal protein L2	0,25	0,42	LinJ.35.1440	XP_001468955.1	T
60S ribosomal protein L22	0,45	-	LinJ.36.4640	XP_001469840.1	T
60S ribosomal protein L23	-	0,47	LinJ.35.3840	XP_001469187.1	T
60S ribosomal protein L23a	0,4	0,41	LinJ.06.0600	XP_003392220.1	T
60S ribosomal protein L27A/L29	0,32	0,32	LinJ.35.3830	XP_001469186.1	T
60S ribosomal protein L32	0,31	0,43	LinJ.35.2040	XP_001469022.1	T
60S Ribosomal protein L36	0,18	0,25	LinJ.21.0800	XP_001465385.1	T
60S ribosomal protein L37	-	0,48	LinJ.33.2070	XP_003392739.1	T
60S ribosomal protein L5	-	0,31	LinJ.35.1880	XP_001469007.1	T
60S ribosomal protein L6	0,45	0,45	LinJ.33.0770	XP_001468157.1	T
60S ribosomal protein L7	0,44	-	LinJ.26.0150	XP_001470365.1	T
60S ribosomal protein L7a	0,47	0,44	LinJ.07.0550	XP_001463269.1	T
60S ribosomal subunit protein L31	0,29	0,28	LinJ.35.3330	XP_003392817.1	T
6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating	0,48	0,2	LinJ.35.3390	XP_001469143.1	T
acetyl-CoA synthetase	0,49	2,06	LinJ.23.0580	XP_001465734.1	T
activated protein kinase c receptor (LACK)	2,71	-	LinJ.28.2940	XP_001470319.2	D*
activated protein kinase c receptor (LACK)	0,46	-	LinJ.28.2940	XP_001470319.2	T*
adenosine kinase	0,43	-	LinJ.30.0940	XP_001466939.1	T
ADF/Cofilin	-	0,41	LinJ.29.0520	XP_001466572.1	T*
ADP,ATP carrier protein 1, mitochondrial precursor,ADP/ATP translocase 1	-	9,95	LinJ.19.0200	XP_001464984.1	T
ADP-ribosylation factor	12,17	0,47	LinJ.31.2890	XP_001467603.1	T
aldehyde dehydrogenase, mitochondrial precursor	2,25	-	LinJ.25.1160	XP_001466145.1	D
aldehyde dehydrogenase, mitochondrial precursor	2,09	-	LinJ.25.1160	XP_001466145.1	T
aldose 1-epimerase	-	2,13	LinJ.35.0990	XP_001468913.1	T
aldose 1-epimerase-like protein	2,71	-	LinJ.23.0470	XP_001465723.1	D
arginyl-tRNA synthetase	0,39	-	LinJ.27.1230	XP_001466367.1	T
ATP synthase F1 subunit gamma protein	0,3	0,47	LinJ.21.2140	XP_001465474.1	T
ATP synthase, epsilon chain	0,4	-	LinJ.30.3660	XP_001467220.1	T
ATPase beta subunit	0,45	0,5	LinJ.25.1210	XP_001466152.1	T
ATP-dependent DEAD/H RNA helicase	2,09	-	LinJ.07.0130	XP_001463224.1	T
ATP-dependent phosphofructokinase	2,03	-	LinJ.29.2620	XP_001466784.1	T
ATP-dependent RNA helicase	0,49	-	LinJ.35.3150	XP_001469120.1	D
calmodulin	0,27	0,24	LinJ.09.0980	XP_001463555.1	T
calpain-like cysteine peptidase	0,46	0,39	LinJ.14.0920	XP_001464271.1	T
calpain-like cysteine peptidase, Clan CA, family C2	-	0,26	LinJ.20.1320	XP_001465262.1	T
calreticulin	2,64	3,39	LinJ.31.2670	XP_001467584.1	D*
calreticulin	3,71	-	LinJ.31.2670	XP_001467584.1	T*
chaperonin containing t-complex protein	2,12	0,49	LinJ.32.1060	XP_001467786.1	D
chaperonin HSP60, mitochondrial precursor	-	4	LinJ.36.2130	XP_001469793.1	T
chaperonin HSP60, mitochondrial precursor	-	3,36	LinJ.36.2140	XP_001469794.1	T
cofilin-like protein	-	0,26	LinJ.29.0520	XP_001466572.1	D
conserved hypothetical protein Lbrm.29.2740	0,39	-	Lbrm.29.2740	CAM40130.1	D
conserved hypothetical protein Lbrm.34.0220	-	0,09	Lbrm_34_0220	CAM43239.1	D
conserved hypothetical protein Lbrm.35.3530	-	0,08	Lbrm.35.3530	CAM44105.1	D

conserved hypothetical protein LinJ.02.0430	-	2,15	LinJ.02.0430	XP_001462734.1	T
conserved hypothetical protein LinJ.04.0400	5,51	-	LinJ.04.0400	XP_001462878.1	D
conserved hypothetical protein LinJ.07.0710	4,94	-	LinJ.07.0710	XP_001463340.1	D
conserved hypothetical protein LinJ.08.1010	0,23	-	LinJ.08.1010	XP_001463434.1	T
conserved hypothetical protein LinJ.09.1070	0,47	-	LinJ.09.1070	XP_001463564.1	T
conserved hypothetical protein LinJ.11.0820	-	0,38	LinJ.11.0820	XP_001463882.1	T
conserved hypothetical protein LinJ.14.0240	0,25	0,28	LinJ.14.0240	XP_001464207.1	T
conserved hypothetical protein LinJ.14.0460	0,26	0,31	LinJ.14.0460	XP_001464229.1	T
conserved hypothetical protein LinJ.15.1170	-	0,46	LinJ.15.1170	XP_003392371.1	T
conserved hypothetical protein LinJ.16.1500	0,38	-	LinJ.16.1500	XP_001464629.1	T
conserved hypothetical protein LinJ.18.0210	3,71	-	LinJ.18.0210	XP_001464838.1	D
conserved hypothetical protein LinJ.18.0210	6	-	LinJ.18.0210	XP_001464838.1	T
conserved hypothetical protein LinJ.19.1150	2,06	-	LinJ.19.1150	XP_001465075.1	T
conserved hypothetical protein LinJ.23.0090	277,74	0,48	LinJ.23.0090	XP_001465686.1	D
conserved hypothetical protein LinJ.23.0810	9,93	2,15	LinJ.23.0810	XP_001465756.1	T
conserved hypothetical protein LinJ.23.1680	2,81	3,94	LinJ.23.1680	XP_001465841.1	D
conserved hypothetical protein LinJ.23.1980	-	2,1	LinJ.23.1980	XP_003392521.1	T
conserved hypothetical protein LinJ.24.2200	5,81	4,15	LinJ.24.2200	XP_001466011.1	T
conserved hypothetical protein LinJ.25.0160	-	0,26	LinJ.25.0160	XP_001466049.1	D
conserved hypothetical protein LinJ.25.0600	0,41	0,47	LinJ.25.0600	XP_001466091.1	T
conserved hypothetical protein LinJ.25.1100	0,19	0,24	LinJ.25.1100	XP_001466139.1	T
conserved hypothetical protein LinJ.25.1670	0,43	0,40	LinJ.25.1670	XP_001466198.1	T
conserved hypothetical protein LinJ.25.2100	0,46	-	LinJ.25.2100	XP_001466241.1	T
conserved hypothetical protein LinJ.26.1960	-	2,77	LinJ.26.1960	XP_001470535.1	D
conserved hypothetical protein LinJ.26.2580	-	0,45	LinJ.26.2580	XP_001470588.1	T
conserved hypothetical protein LinJ.27.1100	0,39	4,15	LinJ.27.1100	XP_001466355.1	D
conserved hypothetical protein LinJ.27.1220	0,42	-	LinJ.27.1220	XP_001466366.1	T
conserved hypothetical protein LinJ.27.1920	0,39	0,37	LinJ.27.1920	XP_001466440.1	T
conserved hypothetical protein LinJ.28.1830	0,04	0,06	LinJ.28.1830	XP_001470210.1	T
conserved hypothetical protein LinJ.29.0170	0,44	0,49	LinJ.29.0170	XP_001466522.1	T
conserved hypothetical protein LinJ.29.0940	-	2,09	LinJ.29.0940	XP_001466612.1	T
conserved hypothetical protein LinJ.30.3740	0,44	0,28	LinJ.30.3740	XP_001467228.1	T
conserved hypothetical protein LinJ.31.1440	0,31	0,30	LinJ.31.1440	XP_001467437.1	T
conserved hypothetical protein LinJ.32.0660	0,49	8,88	LinJ.32.0660	XP_001467738.1	D
conserved hypothetical protein LinJ.32.2330	-	0,37	LinJ.32.2330	XP_001467910.1	D
conserved hypothetical protein LinJ.32.2410	0,48	0,43	LinJ.32.2410	XP_001467918.1	T
conserved hypothetical protein LinJ.32.3000	6,06	-	LinJ.32.3000	XP_001467976.1	T
conserved hypothetical protein LinJ.32.3040	2,78	0,49	LinJ.32.3040	XP_001467979.1	D
conserved hypothetical protein LinJ.32.3410	2,81	0,46	LinJ.32.3410	XP_001468015.1	D
conserved hypothetical protein LinJ.33.0660	0,40	0,42	LinJ.33.0660	XP_001468146.1	T
conserved hypothetical protein LinJ.33.2570	0,35	0,41	LinJ.33.2570	XP_003392763.1	T
conserved hypothetical protein LinJ.33.2940	0,27	0,39	LinJ.33.2940	XP_001468340.1	T
conserved hypothetical protein LinJ.34.0010	0,48	-	LinJ.34.0010	XP_001468388.1	T
conserved hypothetical protein LinJ.34.0960	0,45	-	LinJ.34.0960	XP_001468467.1	T
conserved hypothetical protein LinJ.34.1620	0,25	0,23	LinJ.34.1620	XP_001468533.1	T

conserved hypothetical protein LinJ.34.1630	0,25	0,23	LinJ.34.1630	XP_001468534.1	T
conserved hypothetical protein LinJ.34.2410	0,45	0,38	LinJ.34.2410	XP_001468603.1	T
conserved hypothetical protein LinJ.34.2530	0,32	0,32	LinJ.34.2530	XP_001468615.1	T
conserved hypothetical protein LinJ.34.3590	-	2,96	LinJ.34.3590	XP_001468716.1	T
conserved hypothetical protein LinJ.35.0180	0,45	-	LinJ.35.0180	XP_001468838.1	D
conserved hypothetical protein LinJ.35.3770	0,30	0,33	LinJ.35.3770	XP_001469180.1	T
conserved hypothetical protein LinJ.35.4540	0,39	0,37	LinJ.35.4540	XP_001469256.1	T
conserved hypothetical protein LinJ.35.4990	0,32	0,20	LinJ.35.4990	XP_001469298.1	T
conserved hypothetical protein LinJ.36.0510	2,25	-	LinJ.36.0510	XP_001469558.1	D
conserved hypothetical protein LinJ.36.1030	-	3,63	LinJ.36.1030	XP_001469506.1	D
conserved hypothetical protein LinJ.36.3370	-	0,002	LinJ.36.3370	XP_001469729.1	D
conserved hypothetical protein LinJ.36.3780	0,46	0,45	LinJ.36.3780	XP_001469656.1	T
conserved hypothetical protein LinJ.36.4680	0,37	-	LinJ.36.4680	XP_001469844.1	T
conserved hypothetical protein LinJ.36.5010	0,43	0,49	LinJ.36.5010	XP_001469875.1	T
conserved hypothetical protein LinJ.36.5330	0,35	-	LinJ.36.5330	XP_001469901.1	T
conserved hypothetical protein LinJ.36.6110	0,41	0,40	LinJ.36.6110	XP_001469967.1	T
conserved hypothetical protein LinJ.36.7070	0,39	0,43	LinJ.36.7070	XP_001469385.1	T
conserved hypothetical protein LmJf.34.1360	6,48	0,49	LmJf.34.1360	CAJ07846.1	D
conserved hypothetical protein Tb10.70.1640	-	0,41	Tb10.70.1640	EAN77957.1	D
conserved hypothetical protein Tb11.01.3290	0,10	0,39	Tb11.01.3290	EAN80099.1	D
cyclophilin 2	-	5,91	LinJ.06.0120	XP_001463094.1	T
cyclophilin 4	-	2,12	LinJ.33.1730	XP_001468254.1	T
cyclophilin 40	2,2	2,77	LinJ.35.4830	XP_001469283.1	D
cyclophilin a	0,49	-	LinJ.25.0940	XP_001466123.1	T
cytochrome c	0,41	-	LinJ.16.1390	XP_001464620.1	T
cytochrome c oxidase subunit IV	-	9,43	LinJ.12.0620	XP_003392306.1	T
cytochrome c oxidase subunit V	-	14,07	LinJ.26.1690	XP_001470514.1	T
delta-1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase	0,49	-	LinJ.03.0190	XP_001462773.1	T
dihydrolipoamide acetyltransferase precursor	2,48	0,48	LinJ.36.2790	XP_001469441.1	D
dihydroorotate dehydrogenase	2,01	-	LinJ.16.0540	XP_003392383.1	D
dipeptidyl-peptidase III, metallo-peptidase, Clan M-, Family M49	-	0,3	LinJ.05.0960	XP_001463059.1	T
d-isomer specific 2-hydroxyacid dehydrogenase- protein	3,75	2,08	LinJ.34.4360	XP_001468792.1	T
d-isomer specific 2-hydroxyacid dehydrogenase- protein	-	0,5	LinJ.34.1510	XP_001468522.2	T
elongation factor 1-alpha	3,72	-	LinJ.17.0180	CBZ08557.1	T
elongation factor 1-alpha	2,35	3,07	LinJ.17.0090	XP_001464664.1	D
elongation factor 2	-	0,45	LinJ.36.0190	XP_001469588.1	D*
elongation factor 2	0,48	-	LinJ.36.0190	XP_001469588.1	T*
endoribonuclease L-PSP (pb5)	2,32	0,45	LinJ.23.0220	XP_001465699.1	D
Enolase	0,4	0,42	LinJ.14.1240	XP_001464303.1	T
eukaryotic initiation factor 5a	0,48	0,34	LinJ.25.0750	XP_001466105.1	T
eukaryotic initiation factor 5a	0,48	0,34	LinJ.25.0760	XP_001466106.1	T
eukaryotic translation initiation factor 3 subunit	-	0,08	LinJ.36.4070	XP_001469627.1	D*
eukaryotic translation initiation factor 3 subunit 7-like protein	0,5	-	LinJ.30.3080	XP_001467154.1	T

fatty acid elongase	0,47	0,49	LinJ.14.0700	XP_001464251.1	T
fructose-1,6-bisphosphate aldolase	5,51	0,48	LinJ.36.1320	XP_001469477.1	D*
fructose-1,6-bisphosphate aldolase	-	5,3	LinJ.36.1320	XP_001469477.1	T*
galactokinase-like protein	-	11,58	LinJ.35.2790	XP_001469061.1	T
GDP-mannose pyrophosphorylase	2,76	-	LinJ.23.0120	XP_001465689.1	D*
Gim5A protein, glycosomal membrane protein	0,25	-	LinJ.35.3750	XP_001469178.1	T
glucose transporter, lmg1	0,2	0,4	LinJ.36.6560	XP_001469352.2	T
glucose transporter, lmg2	0,2	0,4	LinJ.36.6550	XP_001469343.1	T
glucose transporter, lmg3	0,2	0,4	LinJ.36.6540	XP_003392839.1	T
glucose-6-phosphate isomerase	-	0,46	LinJ.12.0490	XP_003392293.1	T
glucose-regulated protein 78	0,47	-	LinJ.28.1310	XP_001470161.1	T*
glucose-regulated protein 78	2,78	0,49	LinJ.28.1310	XP_001470161.1	D*
glucose-regulated protein 78	6,48	2,82	LinJ.28.1310	XP_001470161.1	D*
glutamate dehydrogenase	3,8	2,01	LinJ.15.1070	XP_001464440.2	T
glutathione peroxidase-like protein	-	0,48	LinJ.26.0770	XP_001470422.1	T
glycosomal malate dehydrogenase	22,68	4,02	LinJ.19.0710	XP_001465032.1	T
glycosomal phosphoenolpyruvate carboxykinase	277,74	0,48	LinJ.27.1710	XP_001466420.1	D*
glycosomal phosphoenolpyruvate carboxykinase	0,47	6,21	LinJ.27.1710	XP_001466420.1	T*
GP63, leishmanolysin	-	3,63	LinJ.10.0490	XP_001463699.2	T
GP63, leishmanolysin	-	3,87	LinJ.10.0520	XP_001463701.2	T
GTP binding protein	0,29	0,25	LinJ.27.2260	XP_001466463.1	T
GTP-binding protein Rab1	-	4,21	LinJ.27.0620	XP_003392649.1	D
h1 histone-like protein	0,45	0,5	LinJ.33.3390	XP_001468384.1	T
heat shock 70-related protein 1, mitochondrial precursor	-	4,39	LinJ.30.2470	XP_001467093.1	T
heat shock protein	0,44	0,44	LinJ.33.2520	XP_003392758.1	T
heat shock protein	8,23	0,46	LinJ.18.1350	XP_003392406.1	D
heat shock protein 70	-	0,004	LinJ.28.2960	XP_001470324.1	D
heat shock protein 83-1	4,01	2,07	LinJ.33.0350	XP_003392729.1	T
heat shock protein DNAJ	-	0,31	LinJ.27.2350	XP_001466474.1	T
hexokinase	3,81	-	LinJ.21.0300	XP_001465335.1	T
histone H1	-	0,45	LinJ.27.1070	XP_001466353.1	T
histone H2A	8,02	-	LinJ.21.1160	XP_003392461.1	T
histone H2B	-	0,39	LinJ.09.1410	XP_001463598.1	T
histone H3	3,5	-	LinJ.16.0600	XP_001464550.1	T
histone H3	5,92	-	LinJ.10.1050	XP_001463751.1	T
histone H3	11,61	-	LinJ.19.0630	XP_001465025.1	T
histone H3 variant	17,1	2,02	LinJ.19.0630	XP_001465025.1	T
histone H4	17,46	-	LinJ.21.0020	XP_001465510.1	T
HslVU complex proteolytic subunit	3,18	-	LinJ.36.4180	XP_001469616.1	D
hypothetical protein AAK27382	2,81	3,94	-	AAK27382.1	D
hypothetical protein LinJ.02.0520	0,46	-	LinJ.02.0520	XP_001462742.1	T
hypothetical protein LinJ.08.0650	0,31	0,15	LinJ.08.0650	XP_001463403.1	T
hypothetical protein LinJ.15.0730	-	0,09	LinJ.15.0730	XP_003392369.1	T
hypothetical protein LinJ.20.1000	0,40	0,47	LinJ.20.1000	XP_003392442.1	T
hypothetical protein LinJ.30.1140	7,83	0,35	LinJ.30.1140	XP_001466958.1	T

hypothetical protein LinJ.31.1050	0,05	0,02	LinJ.31.1050	XP_001467398.1	T
hypothetical protein SCD6.10	-	0,48	LinJ.25.0550	XP_001466086.1	T
hypothetical protein Tb927.7.980	0,11	-	Tb927.7.980	XP_845722.1	D
i/6 autoantigen-like protein	2,16	-	LinJ.22.1310	XP_001465646.1	D
iron superoxide dismutase	0,46	0,43	LinJ.32.1920	XP_001467867.1	T
isocitrate dehydrogenase [NADP], mitochondrial precursor	0,25	0,35	LinJ.10.0310	XP_001463680.1	T
kinesin	0,46	0,05	LinJ.11.0870	XP_001463887.1	D
kinetoplast-associated protein-like protein	2,05	2,86	LinJ.27.0250	XP_001466296.1	T
kinetoplastid membrane protein-11	0,13	0,19	LinJ.35.2250	XP_001469031.1	T
la RNA binding protein	0,41	-	LinJ.21.0600	XP_001465365.1	T
lysyl-tRNA synthetase	0,25	0,29	LinJ.15.0270	XP_001464365.1	T
malate dehydrogenase	0,12	0,08	LinJ.34.0140	XP_001468401.2	T
mannose phosphate isomerase	5,77	2,26	LinJ.32.1660	XP_001467842.1	D
MAP kinase	2,93	0,29	LinJ.33.1470	XP_001468229.1	T
metallo-peptidase, Clan MA(E), Family 32	0,22	0,48	LinJ.13.0090	XP_001464036.1	T
metallo-peptidase, Clan MA(E), Family M32	0,48	0,45	LinJ.33.2670	XP_001468312.1	T
metallo-peptidase, Clan MF, Family M17	0,27	0,42	LinJ.11.0630	XP_001463863.1	T
microtubule-associated protein	0,24	0,27	LinJ.05.0380	XP_001463001.1	T
mitochondrial associated ribonuclease	-	0,5	LinJ.08.0330	XP_001463374.1	T
mitochondrial phosphate transporter	-	14,45	LinJ.35.4490	XP_001469251.1	T
mitochondrial processing peptidase alpha subunit,metallo-peptidase, Clan ME, Family M16	-	18,84	LinJ.13.0760	XP_001464106.1	T
mitochondrial processing peptidase alpha subunit,metallo-peptidase, Clan ME, Family M16	-	2,02	LinJ.21.0400	XP_001465345.1	T
mitochondrial processing peptidase, beta subunit,metallo-peptidase, Clan ME, Family M16	-	11,73	LinJ.35.1390	XP_001468950.1	T
mitochondrial RNA binding protein 2, MRP2, gBP25	6,05	2,06	LinJ.09.1180	XP_001463575.1	T
N-acyl-L-amino acid amidohydrolase	-	0,48	LinJ.31.1130	XP_001467406.1	T
NADH-cytochrome b5 reductase	0,44	-	LinJ.13.0960	XP_001464125.1	T
NADH-dependent fumarate reductase protein	-	2,86	LinJ.35.0850	XP_001468899.1	T
nucleolar protein	-	5,81	LinJ.10.0210	XP_001463670.1	T
nucleoside diphosphate kinase b	0,25	0,22	LinJ.32.3100	XP_001467985.1	T
nucleosome assembly protein-like protein	0,39	-	LinJ.31.1770	XP_001467471.1	T
oxidoreductase	0,43	0,43	LinJ.36.4380	XP_001470025.1	T
paraflagellar rod protein 1D	0,44	0,45	LinJ.29.1880	XP_003392693.1	T*
paraflagellar rod protein 2C	0,47	-	LinJ.16.1510	XP_001464630.1	T
peptidylprolyl isomerase-like protein histone H2A	0,28	0,28	LinJ.19.1560	XP_001465122.1	T
peroxidoxin	-	0,29	LinJ.23.0050	XP_001465682.1	D
phosphomannomutase	2,16	4,95	LinJ.36.2070	XP_001469787.1	D
polyprenol reductase	-	2,06	LinJ.25.1850	XP_001466216.1	T
polyubiquitin	0,44	0,33	LinJ.09.0950	XP_001463552.2	T
prostaglandin f2-alpha synthase/D-arabinose dehydrogenase	0,38	0,39	LinJ.31.2210	XP_001467513.1	T
proteasome activator protein pa26	0,35	0,43	LinJ.35.0770	XP_001468892.1	T
proteasome alpha 1 subunit	-	0,50	LinJ.35.4910	XP_001469290.1	D
proteasome alpha 2 subunit	0,47	0,46	LinJ.21.2070	XP_001465467.1	D

proteasome alpha 5 subunit	0,48	2,38	LinJ.21.2200	XP_001465480.1	D
proteasome alpha 7 subunit	0,38	-	LinJ.11.0240	XP_001463827.1	T
proteasome beta 3 subunit	3,18	-	LinJ.28.0110	XP_001470046.1	D
proteasome regulatory ATPase subunit 5	2,08	-	LinJ.22.0490	XP_001465580.1	D
proteasome regulatory non-ATP-ase subunit	-	0,37	LinJ.32.1260	XP_001467806.1	D
protein disulfide isomerase	113,56	7,78	LinJ.36.7280	XP_001469404.1	D
protein disulfide isomerase	0,47	8	LinJ.06.1090	XP_001463188.1	T
protein transport protein Sec13	2,27	0,49	LinJ.32.0050	XP_001467687.1	D
P-type H -ATPase	0,29	0,28	LinJ.18.1510	XP_001464964.2	T
Pyridoxal kinase	2,41	-	LinJ.30.1310	XP_001466975.1	D
pyrroline-5-carboxylate reductase	14,16	-	LinJ.13.1420	XP_003392356.1	T
pyruvate dehydrogenase E1 beta subunit	2,01	6,99	LinJ.25.1790	XP_001466210.1	D*
pyruvate dehydrogenase E1 component alpha subunit	0,19	0,37	LinJ.18.1360	XP_001464949.1	T
pyruvate kinase	2,17	0,49	LinJ.35.5450	XP_001468820.1	D*
rab1 small GTP-binding protein	-	0,45	LinJ.10.1250	XP_001463769.1	T
rab7 GTP binding protein	0,44	0,22	LinJ.18.0890	XP_003392405.1	T
ras-related rab-4	-	0,45	LinJ.32.0520	XP_001467752.1	T
reiske iron-sulfur protein precursor	5,77	0,48	LinJ.35.1540	XP_001468974.2	D
replication factor A, 51kDa subunit	3,85	-	LinJ.28.1940	XP_001470220.1	D
ribosomal protein L15	0,44	-	LinJ.35.1890	XP_003392798.1	T
ribosomal protein L1a	0,47	-	LinJ.29.1160	XP_001466636.2	T
ribosomal protein L24	0,42	-	LinJ.36.1160	XP_001469493.2	T
ribosomal protein S20	0,30	0,30	LinJ.28.1100	XP_003392671.1	T
ribosomal protein S25	-	0,45	LinJ.25.1220	XP_001466153.1	T
ribosomal protein S26	0,44	0,30	LinJ.30.3240	XP_001467172.1	T
RNA helicase	12,45	5,15	LinJ.21.1820	XP_001465449.1	D
RNA-binding protein	0,25	0,3	LinJ.32.0790	XP_001467761.1	T
RNA-binding protein	0,32	0,38	LinJ.04.1190	XP_001462957.1	T
RNA-binding protein, UPB1	0,45	0,41	LinJ.25.0500	XP_003392595.1	T
RNA-binding protein, UPB2	0,26	0,25	LinJ.25.0510	XP_001466082.1	T
S-adenosylhomocysteine hydrolase	8,66	0,48	LinJ.36.4100	XP_001469624.1	D*
S-adenosylhomocysteine hydrolase	0,30	0,36	LinJ.36.4100	XP_001469624.1	T*
S-adenosylmethionine synthetase	113,56	-	LinJ.30.3560	XP_003392704.1	D
Sequence 10 from patent US 7700121	0,50	0,27	-	ADL81659.1	D
Sequence 118 from patent US 6638517	4,03	2,22	-	AAR68524.1	D
Sequence 86 from patent US 6365165	0,40	-	-	AAM56148.1	D
Sequence 96 from patent US 6500437	12,45	15,03	-	AAO95731.1	D*
Sequence 96 from patent US 6500437	0,46	0,05	-	AAO95731.1	D*
serine/threonine-protein kinase,protein kinase	2,88	-	LinJ.29.2680	XP_001466789.1	T
seryl-tRNA synthetase	-	0,47	LinJ.11.0100	XP_001463813.1	T
small GTP-binding protein Rab11	0,43	0,49	LinJ.10.0960	XP_001463744.1	T
small myristoylated protein-1	3,95	2,97	LinJ.20.1350	XP_001465265.1	D
soluble promastigote surface antigen PSA-38S	-	0,08	-	ACY70940.1	D
spermidine synthase	-	0,34	LinJ.04.0570	XP_001462895.1	D

splicing factor pter1-like protein	3	0,47	LinJ.07.1020	XP_001463304.1	T
sterol 24-c-methyltransferase	-	3,05	LinJ.36.2510	XP_001469831.1	T
stress-induced protein sti1	3,67	0,49	LinJ.08.1020	XP_001463435.1	D
succinyl-CoA ligase [GDP-forming] beta-chain	5,51	0,48	LinJ.36.3100	XP_001469702.1	D*
succinyl-CoA ligase [GDP-forming] beta-chain	0,49	-	LinJ.36.3100	XP_001469702.1	T*
succinyl-CoA synthetase alpha subunit	-	2	LinJ.25.2220	XP_001466253.1	T
succinyl-diaminopimelate desuccinylase-like protein	8,66	-	LinJ.31.2060	XP_001467498.1	D
Surface membrane glycoprotein GP46/M-2	-	0,08	-	P21978.1	D
T-complex protein 1, beta subunit	2,13	0,49	LinJ.27.1150	XP_001466359.1	D
T-complex protein 1, theta subunit	277,74	0,48	LinJ.36.7240	XP_001469401.1	D
thiol-dependent reductase 1	0,46	0,37	LinJ.33.0260	XP_001468111.1	T
transaldolase	0,49	-	LinJ.16.0760	XP_001464564.1	T
translation elongation factor 1-beta	5,77	21,94	LinJ.34.0890	XP_001468460.1	D*
translation elongation factor 1-beta	0,36	0,25	LinJ.36.1490	XP_001469731.1	T
translation elongation factor 1-beta	2,87	-	LinJ.34.0890	XP_001468460.1	T*
trypanin-like protein	0,39	0,09	LinJ.35.1800	XP_001469000.1	T
trypanothione reductase	-	24,23	LinJ.05.0350	XP_001462998.1	D*
trypanothione reductase	0,44	0,40	LinJ.05.0350	XP_001462998.1	T*
tryparedoxin	-	0,36	LinJ.29.1250	XP_001466642.1	D*
tryparedoxin	4,84	-	LinJ.29.1250	XP_001466642.1	T*
tryparedoxin peroxidase	-	0,08	LinJ.15.1140	XP_001464446.1	D*
tryparedoxin peroxidase	0,45	-	LinJ.15.1140	XP_001464446.1	T*
U3 snoRNA-associated protein UTP11	-	0,28	LmJf.19.0670	XP_001682644.1	D
ubiquitin/ribosomal protein S27a	0,29	0,32	LinJ.36.0660	XP_001469543.1	T
ubiquitin-fusion protein	0,34	0,33	LinJ.31.1930	XP_003392716.1	T
UDP-glucose pyrophosphorylase	2,68	0,47	LinJ.18.0990	XP_001464913.1	D*
vacuolar ATP synthase subunit b	-	24,23	LinJ.28.2610	XP_001470286.1	D*
vacuolar-type proton translocating pyrophosphatase 1	7,56	-	LinJ.31.1240	XP_001467417.1	T

*As proteínas em negrito apresentaram resultados controversos entre as duas técnicas utilizadas, e foi observado que possuíam valores de massa molecular e ponto isoelétrico experimental diferente dos valores preditos em banco de dados (Apêndice 4).

Apêndice 3: Lista de proteínas identificadas com diferença de abundância na forma Amastigota Esplênica. Valores de Fold Change (< 0,5: diminuído; > 2,0: aumentado; - sem alteração); Gene da proteína; Número Identificador no banco de dados NCBI; técnica quantitativa onde foram encontradas (T = TMT e D = DIGE).

Proteína	Fold Change		Gene	Identificador (NCBI)	DIGE / TMT
	BH46	BH400			
1,2-Dihydroxy-3-keto-5-methylthiopentene dioxygenase	7,91	3,7	LinJ.20.0980	XP_001465230.1	T
14-3-3 protein	2,04	-	LinJ.11.0350	XP_001463837.1	T
14-3-3 protein-like protein	7,85	2,01	LinJ.36.3360	XP_001469728.1	T*
2,3-bisphosphoglycerate-independent phosphoglycerate mutase	0,07	-	LinJ.36.6960	XP_003392848.1	D*
2,4-dihydroxyhept-2-ene-1,7-dioic acid aldolase	0,49	0,15	LinJ.25.2090	XP_001466240.1	D
20S proteasome subunit alpha 5	7,93	3,95	LinJ.21.2200	XP_001465480.1	T
2-oxoglutarate dehydrogenase, E2 component, dihydrolipoamide succinyltransferase	14,41	-	LinJ.28.2600	XP_001470285.1	T
3,2-trans-enoyl-CoA isomerase, mitochondrial precursor	0,35	0,19	LinJ.31.2320	XP_001467527.1	D*
3,2-trans-enoyl-CoA isomerase, mitochondrial precursor	-	3,75	LinJ.31.2320	XP_001467527.1	T*
3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase	4,13	4,19	LinJ.30.3230	XP_001467171.1	T
3-ketoacyl-CoA thiolase	3,86	-	LinJ.23.0860	XP_003860986.1	T
40S ribosomal protein S12	-	0,09	LinJ.13.0460	XP_001464077.1	D*
40S ribosomal protein S12	4,03	-	LinJ.13.0460	XP_001464077.1	T*
40S ribosomal protein S13	3,8	-	LinJ.33.3300	XP_001468375.1	T
40S ribosomal protein S15	0,5	0,15	LinJ.22.0340	XP_001465565.1	T
40S ribosomal protein S16	-	2,07	LinJ.26.0840	XP_001470429.1	T
40S ribosomal protein S17	-	4,02	LinJ.28.2750	XP_001470300.1	T
40S ribosomal protein S21	0,43	-	LinJ.11.0780	XP_001463878.1	T
40S ribosomal protein S23	2,17	-	LinJ.21.1300	XP_003392475.1	T
40S ribosomal protein S24e	0,41	0,39	LinJ.36.3020	XP_001469694.1	T
40S ribosomal protein S3	-	20,99	LinJ.33.0960	XP_001468174.1	T
40S ribosomal protein S3A	3,91	-	LinJ.35.0400	XP_001468859.1	T
40S ribosomal protein S4	-	2,13	LinJ.13.1130	XP_001464142.1	T
40S ribosomal protein S5	3,85	-	LinJ.11.0960	XP_001463896.1	T
40S ribosomal protein S8	-	3,25	LinJ.24.2160	XP_001466007.1	T
40S ribosomal protein SA	20,78	3,52	LinJ.36.5350	XP_001469903.1	T
4-methyl-5(beta-hydroxyethyl)-thiazole monophosphate synthesis protein	0,39	0,31	LinJ.30.0800	XP_001466925.1	T
60S acidic ribosomal protein P2	2,01	-	LinJ.30.3780	XP_001467168.1	T
60S acidic ribosomal subunit protein	0,46	-	LinJ.27.1300	XP_001466374.1	D*
60S acidic ribosomal subunit protein	0,47	-	LinJ.27.1300	XP_001466374.1	T*
60S ribosomal protein L11 (L5, L16)	-	0,47	LinJ.22.0004	XP_003392484.1	T
60S ribosomal protein L13	0,48	-	LinJ.29.2570	XP_001466779.1	T

60S ribosomal protein L13a	4,14	2,07	LinJ.34.0910	XP_001468462.1	T
60S ribosomal protein L17	3,68	3,83	LinJ.24.0040	XP_001465868.1	T
60S ribosomal protein L18a	-	3,67	LinJ.35.0600	XP_001468876.1	T
60S ribosomal protein L2	3,8	4,1	LinJ.35.1440	XP_001468955.1	T
60S ribosomal protein L21	-	2,03	LinJ.16.0470	XP_001464535.1	T
60S ribosomal protein L22	21,69	-	LinJ.36.4640	XP_001469840.1	T
60S ribosomal protein L23a	-	17,18	LinJ.06.0600	XP_003392220.1	T
60S ribosomal protein L28	0,28	0,31	LinJ.11.1110	XP_001463910.1	T
60S ribosomal protein L32	0,47	-	LinJ.35.2040	XP_001469022.1	T
60S ribosomal protein L34	3,75	5,81	LinJ.18.1380	XP_001464951.1	T
60S ribosomal protein L35	0,47	-	LinJ.26.2350	XP_001470572.1	T
60S ribosomal protein L37	2,06	11,53	LinJ.33.2070	XP_003392739.1	T
60S ribosomal protein L6	-	3,86	LinJ.33.0770	XP_001468157.1	T
60S ribosomal protein L7	3,55	-	LinJ.26.0150	XP_001470365.1	T
60S ribosomal protein L7a	13,55	-	LinJ.07.0550	XP_001463269.1	T
60S ribosomal protein L9	-	3,04	LinJ.21.1290	XP_003392474.1	T
60S ribosomal subunit protein L31	5,82	2,12	LinJ.35.3330	XP_003392817.1	T
6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating	-	2	LinJ.35.3390	XP_001469143.1	T
aconitase	4,15	0,31	LinJ.18.0510	XP_001464867.1	T
activated protein kinase c receptor (LACK)	0,46	-	LinJ.28.2940	XP_001470319.2	D*
adenosine kinase	14,07	3,75	LinJ.30.0940	XP_001466939.1	T
ADP,ATP carrier protein 1, mitochondrial precursor,ADP/ATP translocase 1	-	2,04	LinJ.19.0200	XP_001464984.1	T
ADP-ribosylation factor	10,19	-	LinJ.31.2890	XP_001467603.1	T
aldehyde dehydrogenase, mitochondrial precursor	0,49	-	LinJ.25.1160	XP_001466145.1	D
aldose 1-epimerase-like protein	0,46	-	LinJ.23.0470	XP_001465723.1	D
alkyldihydroxyacetonephosphate synthase	-	2,1	LinJ.30.0120	XP_001466826.1	T
arginyl-tRNA synthetase	-	3,85	LinJ.27.1230	XP_001466367.1	T
ATP synthase F1 subunit gamma protein	13,79	14,21	LinJ.21.2140	XP_001465474.1	T
ATP synthase, epsilon chain	2,16	12,91	LinJ.30.3660	XP_001467220.1	T
ATPase beta subunit	13,86	2,15	LinJ.25.2590	XP_003888459.1	T
ATPase beta subunit	6,88	7,17	LinJ.25.1210	XP_001466152.1	T
ATP-dependent RNA helicase	0,42	-	LinJ.35.3150	XP_001469120.1	D
ATP-dependent RNA helicase	2,19	-	LinJ.32.0410	XP_001467723.1	T
biotin/lipoate protein ligase-like protein	2,05	-	LinJ.31.1070	XP_001467400.1	T
calpain-like cysteine peptidase, Clan CA, family C2	-	2,06	LinJ.20.1320	XP_001465262.1	T
calreticulin	-	0,43	LinJ.31.2670	XP_001467584.1	D*
cathepsin L-like protease	5,61	0,32	LinJ.08.0960	XP_003392238.1	D
chaperonin HSP60, mitochondrial precursor	0,46	0,4	LinJ.36.2130	XP_001469793.1	T
chaperonin HSP60, mitochondrial precursor	3,11	-	LinJ.36.2140	XP_001469794.1	T
citrate synthase	-	3,78	LinJ.18.0690	XP_001464885.1	T
cofilin-like protein	-	0,46	LinJ.29.0520	XP_001466572.1	D
conserved hypothetical protein Lbrm.34.0220	0,42	12,09	Lbrm_34_0220	CAM43239.1	D
conserved hypothetical protein LinJ.04.0400	0,32	-	LinJ.04.0400	XP_001462878.1	D

conserved hypothetical protein LinJ.05.0450	0,41	-	LinJ.05.0450	XP_001463008.1	D
conserved hypothetical protein LinJ.06.0030	2,23	2,16	LinJ.06.0030	XP_001463087.1	T
conserved hypothetical protein LinJ.07.0710	0,35	-	LinJ.07.0710	XP_001463340.1	D
conserved hypothetical protein LinJ.08.1010	0,41	-	LinJ.08.1010	XP_001463434.1	T
conserved hypothetical protein LinJ.09.1070	2,01	-	LinJ.09.1070	XP_001463564.1	T
conserved hypothetical protein LinJ.10.1420	-	0,17	LinJ.10.1420	XP_001463784.1	D
conserved hypothetical protein LinJ.11.0820	5,82	6	LinJ.11.0820	XP_001463882.1	T
conserved hypothetical protein LinJ.13.0270	0,49	-	LinJ.13.0270	XP_001464059.1	T
conserved hypothetical protein LinJ.14.0190	0,40	-	LinJ.14.0190	XP_001464202.1	T
conserved hypothetical protein LinJ.14.0460	-	20,05	LinJ.14.0460	XP_001464229.1	T
conserved hypothetical protein LinJ.14.1540	-	3,89	LinJ.14.1540	XP_001464332.1	T
conserved hypothetical protein LinJ.15.1170	5,83	14,25	LinJ.15.1170	XP_003392371.1	T
conserved hypothetical protein LinJ.17.0010	3,94	-	LinJ.17.0010	XP_001464656.1	T
conserved hypothetical protein LinJ.21.0440	2,18	14,02	LinJ.21.0440	XP_001465349.1	T
conserved hypothetical protein LinJ.23.0090	0,001	-	LinJ.23.0090	XP_001465686.1	D
conserved hypothetical protein LinJ.23.1680	0,48	0,40	LinJ.23.1680	XP_001465841.1	D
conserved hypothetical protein LinJ.25.0160	-	0,46	LinJ.25.0160	XP_001466049.1	D
conserved hypothetical protein LinJ.25.0600	7,98	-	LinJ.25.0600	XP_001466091.1	T
conserved hypothetical protein LinJ.25.1100	-	23,76	LinJ.25.1100	XP_001466139.1	T
conserved hypothetical protein LinJ.25.1670	11,54	2,06	LinJ.25.1670	XP_001466198.1	T
conserved hypothetical protein LinJ.25.2100	9,94	-	LinJ.25.2100	XP_001466241.1	T
conserved hypothetical protein LinJ.26.1080	-	0,47	LinJ.26.1080	XP_001470450.1	T
conserved hypothetical protein LinJ.26.1960	-	0,46	LinJ.26.1960	XP_001470535.1	D
conserved hypothetical protein LinJ.27.1100	5,45	0,33	LinJ.27.1100	XP_001466355.1	D
conserved hypothetical protein LinJ.27.1920	24,46	-	LinJ.27.1920	XP_001466440.1	T
conserved hypothetical protein LinJ.28.1830	42,05	0,42	LinJ.28.1830	XP_001470210.1	T
conserved hypothetical protein LinJ.30.3360	-	0,32	LinJ.30.3360	XP_001467184.1	T
conserved hypothetical protein LinJ.30.3740	19,88	-	LinJ.30.3740	XP_001467228.1	T
conserved hypothetical protein LinJ.31.1440	27,04	-	LinJ.31.1440	XP_001467437.1	T
conserved hypothetical protein LinJ.32.0660	-	0,16	LinJ.32.0660	XP_001467738.1	D
conserved hypothetical protein LinJ.32.2330	-	0,09	LinJ.32.2330	XP_001467910.1	D
conserved hypothetical protein LinJ.32.2410	7,95	6,01	LinJ.32.2410	XP_001467918.1	T
conserved hypothetical protein LinJ.32.3040	0,46	-	LinJ.32.3040	XP_001467979.1	D
conserved hypothetical protein LinJ.32.3200	-	2,05	LinJ.32.3200	XP_001467994.1	T
conserved hypothetical protein LinJ.32.3410	0,50	-	LinJ.32.3410	XP_001468015.1	D
conserved hypothetical protein LinJ.33.2570	-	4,01	LinJ.33.2570	XP_003392763.1	T
conserved hypothetical protein LinJ.33.2940	26,76	-	LinJ.33.2940	XP_001468340.1	T
conserved hypothetical protein LinJ.34.0710	6,04	-	LinJ.34.0710	XP_001468458.2	T
conserved hypothetical protein LinJ.34.0720	6,04	-	LinJ.34.0720	XP_001468807.2	T
conserved hypothetical protein LinJ.34.0960	-	2,07	LinJ.34.0960	XP_001468467.1	T
conserved hypothetical protein LinJ.34.1620	3,6	-	LinJ.34.1620	XP_001468533.1	T
conserved hypothetical protein LinJ.34.1630	3,6	-	LinJ.34.1630	XP_001468534.1	T
conserved hypothetical protein LinJ.34.2410	2,04	3,99	LinJ.34.2410	XP_001468603.1	T
conserved hypothetical protein LinJ.34.2530	5,96	5,95	LinJ.34.2530	XP_001468615.1	T
conserved hypothetical protein LinJ.35.0180	2,94	-	LinJ.35.0180	XP_001468838.1	D

conserved hypothetical protein LinJ.35.3770	17,49	-	LinJ.35.3770	XP_001469180.1	T
conserved hypothetical protein LinJ.35.4540	0,47	20,78	LinJ.35.4540	XP_001469256.1	T
conserved hypothetical protein LinJ.35.4990	3,06	9,91	LinJ.35.4990	XP_001469298.1	T
conserved hypothetical protein LinJ.36.0510	0,49	-	LinJ.36.0510	XP_001469558.1	D
conserved hypothetical protein LinJ.36.1030	-	0,42	LinJ.36.1030	XP_001469506.1	D
conserved hypothetical protein LinJ.36.3370	-	102,17	LinJ.36.3370	XP_001469729.1	D
conserved hypothetical protein LinJ.36.3780	5,71	7,85	LinJ.36.3780	XP_001469656.1	T
conserved hypothetical protein LinJ.36.4680	-	3,12	LinJ.36.4680	XP_001469844.1	T
conserved hypothetical protein LinJ.36.5010	3,75	3,01	LinJ.36.5010	XP_001469875.1	T
conserved hypothetical protein LinJ.36.6170	-	2,05	LinJ.36.6170	XP_001469973.1	T
conserved hypothetical protein LinJ.36.7070	-	5,95	LinJ.36.7070	XP_001469385.1	T
conserved hypothetical protein LmJf.34.1360	0,40	-	LmJf.34.1360	CAJ07846.1	D
conserved hypothetical protein Tb10.70.1640	5,61	3,74	Tb10.70.1640	EAN77957.1	D
conserved hypothetical protein Tb11.01.3290	228	4,22	Tb11.01.3290	EAN80099.1	D
conserved hypothetical protein Tb11.01.8680	-	0,09	Tb11.01.8680	EAN80635.1	D
cyclophilin 4	0,24	-	LinJ.33.1730	XP_001468254.1	T
cyclophilin 40	0,49	-	LinJ.35.4830	XP_001469283.1	D
cyclophilin a	0,5	0,43	LinJ.25.0940	XP_001466123.1	T
cystathione gamma lyase	-	2,1	LinJ.35.3280	XP_001469133.1	T
cytochrome c	0,39	0,27	LinJ.16.1390	XP_001464620.1	T
cytoskeleton-associated protein CAP5.5,cysteine peptidase, Clan CA, family C2	3,72	-	LinJ.31.0450	XP_001467313.1	T
dihydrolipoamide acetyltransferase precursor	0,48	-	LinJ.36.2790	XP_001469441.1	D
dihydrolipoamide acetyltransferase precursor like protein	3,84	-	LinJ.21.0610	XP_001465366.1	T
dihydrolipoamide dehydrogenase	0,47	0,48	LinJ.32.3510	XP_001468025.1	T
dihydroorotate dehydrogenase	0,50	-	LinJ.16.0540	XP_003392383.1	D
d-isomer specific 2-hydroxyacid dehydrogenase- protein	-	14,04	LinJ.34.1510	XP_001468522.2	T
elongation factor 1-alpha	0,49	-	LinJ.17.0180	CBZ08557.1	T
elongation factor 1-alpha	0,48	0,47	LinJ.17.0090	XP_001464664.1	D
elongation factor 1-beta	-	0,35	LmxM.33.0820	CBZ30222.1	D
elongation factor 1-gamma	-	9,9	LinJ.09.1020	XP_001463559.1	T
elongation factor 1-gamma	12,12	-	LinJ.33.1630	XP_001468244.1	T
elongation factor 2	-	0,09	LinJ.36.0190	XP_001469588.1	D*
elongation factor 2	6,1	-	LinJ.36.0190	XP_001469588.1	T*
endoribonuclease L-PSP (pb5)	0,48	0,05	LinJ.23.0220	XP_001465699.1	D
eukaryotic initiation factor 5a	-	5,77	LinJ.25.0750	XP_001466105.1	T
eukaryotic initiation factor 5a	-	5,77	LinJ.25.0760	XP_001466106.1	T
eukaryotic translation initiation factor 3 subunit	-	0,42	LinJ.36.4070	XP_001469627.1	D*
eukaryotic translation initiation factor 3 subunit	3,75	5,9	LinJ.36.4070	XP_001469627.1	T*
eukaryotic translation initiation factor 3 subunit 7-like protein	-	0,27	LinJ.30.3080	XP_001467154.1	T
fatty acid elongase	3,56	14,39	LinJ.14.0700	XP_001464251.1	T
fructose-1,6-bisphosphate aldolase	0,32	-	LinJ.36.1320	XP_001469477.1	D*
galactokinase-like protein	0,41	0,18	LinJ.35.2790	XP_001469061.1	T
GDP-mannose pyrophosphorylase	-	0,13	LinJ.23.0120	XP_001465689.1	D*

Gim5A protein, glycosomal membrane protein	3,52	5,74	LinJ.35.3750	XP_001469178.1	T
glucose transporter, lmg1	-	3,67	LinJ.36.6560	XP_001469352.2	T
glucose transporter, lmg2	-	3,67	LinJ.36.6550	XP_001469343.1	T
glucose transporter, lmg3	-	3,67	LinJ.36.6540	XP_003392839.1	T
glucose-regulated protein 78	4,27	-	LinJ.28.1310	XP_001470161.1	T*
glucose-regulated protein 78	0,46	-	LinJ.28.1310	XP_001470161.1	D*
glucose-regulated protein 78	0,28	-	LinJ.28.1310	XP_001470161.1	D*
glutamate dehydrogenase	0,31	-	LinJ.15.1070	XP_001464440.2	T
glutathione peroxidase-like protein	-	0,41	LinJ.26.0770	XP_001470422.1	T
glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, glycosomal	-	0,47	LinJ.30.3000	XP_001467146.1	T
glycosomal malate dehydrogenase	0,33	0,46	LinJ.19.0710	XP_001465032.1	T
glycosomal membrane protein	-	3,72	LinJ.28.2430	XP_001470269.1	T
glycosomal phosphoenolpyruvate carboxykinase	0,001	-	LinJ.27.1710	XP_001466420.1	D*
glycosomal phosphoenolpyruvate carboxykinase	-	7,23	LinJ.27.1710	XP_001466420.1	T*
GTP binding protein	3,64	25,1	LinJ.27.2260	XP_001466463.1	T
GTP-binding protein Rab1	-	0,39	LinJ.27.0620	XP_003392649.1	D
h1 histone-like protein	-	12,29	LinJ.33.3390	XP_001468384.1	T
heat shock protein	14,21	2	LinJ.33.2520	XP_003392758.1	T
heat shock protein	0,19	-	LinJ.18.1350	XP_003392406.1	D
heat shock protein 70	0,38	102,17	LinJ.28.2960	XP_001470324.1	D
heat shock protein 70-related protein	0,47	12,48	LinJ.26.1220	XP_001470464.1	T
heat shock protein 83-1	0,48	0,43	LinJ.33.0350	XP_003392729.1	T
heat shock protein DNAJ	20,16	-	LinJ.27.2350	XP_001466474.1	T
histone H1	0,5	0,3	LinJ.27.1070	XP_001466353.1	T
histone H2A	0,42	-	LinJ.21.1160	XP_003392461.1	T
histone H2B	-	2,09	LinJ.09.1410	XP_001463598.1	T
histone H3	0,43	0,41	LinJ.10.1050	XP_001463751.1	T
histone H3	0,24	-	LinJ.16.0600	XP_001464550.1	T
histone H3	0,46	-	LinJ.19.0630	XP_001465025.1	T
histone H3 variant	0,41	0,41	LinJ.19.0630	XP_001465025.1	T
HslVU complex proteolytic subunit	0,49	-	LinJ.36.4180	XP_001469616.1	D
hypothetical protein AAK27382	0,50	0,40	-	AAK27382.1	D
hypothetical protein LinJ.08.0650	22,77	17,42	LinJ.08.0650	XP_001463403.1	T
hypothetical protein LinJ.15.0730	0,32	33,57	LinJ.15.0730	XP_003392369.1	T
hypothetical protein LinJ.20.1000	-	3,65	LinJ.20.1000	XP_003392442.1	T
hypothetical protein LinJ.30.1140	26,5	0,32	LinJ.30.1140	XP_001466958.1	T
hypothetical protein LinJ.31.1050	28,11	-	LinJ.31.1050	XP_001467398.1	T
hypothetical protein LinJ.34.2350	3,98	-	LinJ.34.2350	XP_003392787.1	T
hypothetical protein LinJ.34.2360	3,98	-	LinJ.34.2360	XP_001468598.2	T
hypothetical protein Tb927.7.980	14,22	6,48	Tb927.7.980	XP_845722.1	D
hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase	4,07	-	LinJ.21.0980	XP_003392447.1	T
iron superoxide dismutase	2,88	-	LinJ.32.1920	XP_001467867.1	T
isocitrate dehydrogenase [NADP], mitochondrial precursor	16,83	5,5	LinJ.10.0310	XP_001463680.1	T
kinesin	0,43	0,06	LinJ.11.0870	XP_001463887.1	D

kinesin	0,13	-	LinJ.16.1550	XP_001464634.2	T
kinesin K39	-	0,48	LinJ.14.1190	XP_001464299.2	T
kinetoplast-associated protein-like protein	0,16	0,13	LinJ.27.0250	XP_001466296.1	T
lysyl-tRNA synthetase	21,63	9,93	LinJ.15.0270	XP_001464365.1	T
malate dehydrogenase	31,13	3,78	LinJ.34.0140	XP_001468401.2	T
mannose phosphate isomerase	0,31	-	LinJ.32.1660	XP_001467842.1	D
MAP kinase	-	22,23	LinJ.33.1470	XP_001468229.1	T
metallo-peptidase, Clan MA(E), Family 32	0,43	0,41	LinJ.13.0090	XP_001464036.1	T
metallo-peptidase, Clan MA(E), Family M32	2,01	-	LinJ.33.2670	XP_001468312.1	T
mitochondrial associated ribonuclease	2,93	-	LinJ.08.0330	XP_001463374.1	T
mitochondrial malate dehydrogenase	2,88	2,96	LinJ.34.0170	XP_001468404.1	T
mitochondrial phosphate transporter	-	0,44	LinJ.35.4490	XP_001469251.1	T
mitochondrial processing peptidase alpha subunit, metallo-peptidase, Clan ME, Family M16	0,27	0,27	LinJ.21.0400	XP_001465345.1	T
mitochondrial processing peptidase, beta subunit, metallo-peptidase, Clan ME, Family M16	-	0,49	LinJ.35.1390	XP_001468950.1	T
mitochondrial RNA binding protein 1, MRP1, gBP21	0,46	0,4	LinJ.27.0980	XP_001466345.1	T
N-acyl-L-amino acid amidohydrolase	2,86	-	LinJ.31.1130	XP_001467406.1	T
NADH-dependent fumarate reductase protein	3,8	-	LinJ.35.0850	XP_001468899.1	T
nucleolar protein	0,5	0,4	LinJ.10.0210	XP_001463670.1	T
nucleoside diphosphate kinase b	4,33	7,65	LinJ.32.3100	XP_001467985.1	T
orotidine-5-phosphate decarboxylase/orotate phosphoribosyltransferase, OMPDCase-OPRTase	3,75	-	LinJ.16.0560	XP_001464543.1	T
oxidoreductase	11,96	3,84	LinJ.36.4380	XP_001470025.1	T
peptidylprolyl isomerase-like protein histone H2A	24,3	3,87	LinJ.19.1560	XP_001465122.1	T
peroxidoxin	-	0,08	LinJ.23.0050	XP_001465682.1	D
phosphomannomutase	-	0,09	LinJ.36.2070	XP_001469787.1	D
polyubiquitin	-	6,04	LinJ.09.0950	XP_001463552.2	T
prostaglandin f2-alpha synthase/D-arabinose dehydrogenase	7,26	6,17	LinJ.31.2210	XP_001467513.1	T
proteasome activator protein pa26	7,9	3,79	LinJ.35.0770	XP_001468892.1	T
proteasome alpha 1 subunit	-	0,08	LinJ.35.4910	XP_001469290.1	D
proteasome alpha 2 subunit	-	0,44	LinJ.21.2070	XP_001465467.1	D
proteasome alpha 3 subunit	-	0,34	LinJ.14.0310	XP_001464214.1	D
proteasome alpha 5 subunit	-	0,09	LinJ.21.2200	XP_001465480.1	D
proteasome beta 3 subunit	0,49	-	LinJ.28.0110	XP_001470046.1	D
proteasome regulatory ATPase subunit 5	0,50	-	LinJ.22.0490	XP_001465580.1	D
proteasome regulatory non-ATP-ase subunit	-	0,50	LinJ.32.1260	XP_001467806.1	D
protein disulfide isomerase	0,004	-	LinJ.36.7280	XP_001469404.1	D
protein disulfide isomerase	2,03	2,01	LinJ.26.0630	XP_001470409.1	T
protein transport protein Sec13	0,49	-	LinJ.32.0050	XP_001467687.1	D
P-type H -ATPase	10,01	-	LinJ.18.1510	XP_001464964.2	T
Pyridoxal kinase	0,48	-	LinJ.30.1310	XP_001466975.1	D
pyrroline-5-carboxylate reductase	0,45	-	LinJ.13.1420	XP_003392356.1	T
pyruvate dehydrogenase E1 beta subunit	0,50	0,25	LinJ.25.1790	XP_001466210.1	D*
pyruvate dehydrogenase E1 beta subunit	3,97	-	LinJ.25.1790	XP_001466210.1	T*

pyruvate dehydrogenase E1 component alpha subunit	-	30,92	LinJ.18.1360	XP_001464949.1	T
pyruvate kinase	-	0,35	LinJ.35.5450	XP_001468820.1	T*
pyruvate phosphate dikinase	2,76	4,68	LinJ.11.1000	XP_001463900.2	T
rab1 small GTP-binding protein	12,3	3,93	LinJ.10.1250	XP_001463769.1	T
rab7 GTP binding protein	21,67	3,89	LinJ.18.0890	XP_003392405.1	T
ras-related rab-4	12,3	3,93	LinJ.32.0520	XP_001467752.1	T
reiske iron-sulfur protein precursor	0,31	-	LinJ.35.1540	XP_001468974.2	D
replication factor A, 51kDa subunit	0,41	-	LinJ.28.1940	XP_001470220.1	D
ribonucleoprotein p18, mitochondrial precursor	3,79	-	LinJ.15.0330	XP_001464371.1	T
ribosomal protein L1a	3,03	2,04	LinJ.29.1160	XP_001466636.2	T
ribosomal protein L24	20,14	-	LinJ.36.1160	XP_001469493.2	T
ribosomal protein S20	-	2,06	LinJ.28.1100	XP_003392671.1	T
ribosomal protein S25	5,97	12,25	LinJ.25.1220	XP_001466153.1	T
ribosomal protein S26	4,03	2,07	LinJ.30.3240	XP_001467172.1	T
ribosomal protein S6,NPH2/RS6-like protein	-	2	LinJ.15.1530	XP_001464476.1	T
RNA helicase	0,09	0,45	LinJ.21.1820	XP_001465449.1	D
RNA-binding protein	2,03	2,04	LinJ.35.2240	XP_003392812.1	T
RNA-binding protein	3,84	-	LinJ.32.0790	XP_001467761.1	T
RNA-binding protein	13,69	-	LinJ.04.1190	XP_001462957.1	T
RNA-binding protein, UPB1	-	2,06	LinJ.25.0500	XP_003392595.1	T
RNA-binding protein, UPB2	5,91	2,94	LinJ.25.0510	XP_001466082.1	T
S-adenosylhomocysteine hydrolase	0,17	-	LinJ.36.4100	XP_001469624.1	D*
S-adenosylmethionine synthetase	0,004	-	LinJ.30.3560	XP_003392704.1	D
Sequence 10 from patent US 7700121	2,32	6,52	-	ADL81659.1	D
Sequence 118 from patent US 6638517	0,40	0,49	-	AAR68524.1	D
Sequence 86 from patent US 6365165	3,97	-	-	AAM56148.1	D
Sequence 96 from patent US 6500437	0,09	0,09	-	AAO95731.1	D*
Sequence 96 from patent US 6500437	0,47	0,20	-	AAO95731.1	D*
seryl-tRNA synthetase	-	2,89	LinJ.11.0100	XP_001463813.1	T
small GTP-binding protein Rab1	2,9	-	LinJ.27.0620	XP_003392649.1	T
small GTP-binding protein Rab11	-	2,08	LinJ.10.0960	XP_001463744.1	T
small myristoylated protein-1	0,29	0,45	LinJ.20.1350	XP_001465265.1	D
soluble promastigote surface antigen PSA-38S	-	0,27	-	ACY70940.1	D
splicing factor ptrs1-like protein	0,29	-	LinJ.07.1020	XP_001463304.1	T
stress-induced protein sti1	0,42	-	LinJ.08.1020	XP_001463435.1	D
stress-inducible protein STI1 homolog	0,42	0,41	LinJ.36.0080	XP_001469599.1	T
succinyl-CoA ligase [GDP-forming] beta-chain	0,32	-	LinJ.36.3100	XP_001469702.1	D*
succinyl-CoA ligase [GDP-forming] beta-chain	2,8	-	LinJ.36.3100	XP_001469702.1	T*
succinyl-coA:3-ketoacid-coenzyme A transferase, mitochondrial precursor	2,86	-	LinJ.33.2470	XP_003392753.1	T
succinyl-diaminopimelate desuccinylase-like protein	0,17	-	LinJ.31.2060	XP_001467498.1	D
Surface membrane glycoprotein GP46/M-2	-	0,27	-	P21978.1	D
T-complex protein 1, theta subunit	0,001	-	LinJ.36.7240	XP_001469401.1	D
thimet oligopeptidase,metallo-peptidase, Clan MA(E), Family M3	3,05	-	LinJ.26.1550	XP_001470502.1	T

thiol-dependent reductase 1	-	2,97	LinJ.33.0260	XP_001468111.1	T
transaldolase	0,43	0,40	LinJ.16.0760	XP_001464564.1	T
translation elongation factor 1-beta	0,31	0,35	LinJ.34.0890	XP_001468460.1	D*
translation elongation factor 1-beta	0,15	0,49	LinJ.34.0890	XP_001468460.1	T*
translation elongation factor 1-beta	16,18	3,84	LinJ.36.1490	XP_001469731.1	T
triosephosphate isomerase	2,09	-	LinJ.24.0870	XP_001465915.1	T
trypanin-like protein	11,88	26,45	LinJ.35.1800	XP_001469000.1	T
trypanothione reductase	-	0,31	LinJ.05.0350	XP_001462998.1	D*
tryparedoxin	0,29	0,05	LinJ.29.1250	XP_001466642.1	D*
tryparedoxin peroxidase	0,22	0,09	LinJ.15.1140	XP_001464446.1	D*
tryparedoxin peroxidase	-	0,43	LinJ.15.1140	XP_001464446.1	T*
U3 small nucleolar ribonucleoprotein protein MPP10	0,35	-	LinJ.29.0780	XP_001466597.1	D
U3 snoRNA-associated protein UTP11	0,45	6,34	LmJf.19.0670	XP_001682644.1	D
ubiquitin/ribosomal protein S27a	-	13,83	LinJ.36.0660	XP_001469543.1	T
ubiquitin-fusion protein	-	7,9	LinJ.31.1930	XP_003392716.1	T
UDP-glucose pyrophosphorylase	3,98	3,99	LinJ.18.0990	XP_001464913.1	T*
vacuolar ATP synthase subunit b	3,8	14,56	LinJ.28.2610	XP_001470286.1	T*

*As proteínas em negrito apresentaram resultados controversos entre as duas técnicas utilizadas, e foi observado que possuíam valores de massa molecular e ponto isoelétrico experimental diferente dos valores preditos em banco de dados (Apêndice 4).

Apêndice 4: Tabela de proteínas que apresentaram alterações nos valores de Massa Molecular e/ou Ponto Isoelétrico experimentais dos valores preditos. Valores de Fold Change (< 0,5: diminuído; > 2,0: aumentado; - sem alteração); Gene da proteína; Número Identificador do banco de dados NCBI; Ponto Isoelétrico / Massa Molecular Experimental; Ponto Isoelétrico / Massa Molecular Predito.

Proteína	Promastigota		Ama. Axênica		Ama. Esplênica		Gene	Accession (NCBI)	pI/MW - Experimental	pI/MW - Predito
	BH46	BH400	BH46	BH400	BH46	BH400				
2,3-bisphosphoglycerate-independent phosphoglycerate mutase	3,94	0,40	13,09	0,47	0,07	-	LinJ.36.6960	XP_003392848	5.40 / 97.00	5.26 / 60.76
3,2-trans-enoyl-CoA isomerase, mitochondrial precursor	3,68	0,42	4,94	8,18	0,35	0,19	LinJ.31.2320	XP_001467527	5.59 / 56.00	7.71 / 38.65
40S ribosomal protein S12	-	13,38	-	-	-	0,09	LinJ.13.0460	XP_001464077	4.77 / 18.00	4.77 / 15.60
60S acidic ribosomal subunit protein	-	-	2,78	0,49	0,46	-	LinJ.27.1300	XP_001466374	5.13/46.00	5.01 / 34.77
activated protein kinase c receptor (LACK)	2,61	-	2,71	-	0,46	-	LinJ.28.2940	XP_001470319	6.56 / 47.00	6.05 / 34.37
calreticulin	0,47	-	2,64	3,39	-	0,43	LinJ.31.2670	XP_001467584	4.40/70.00 4.44/83.00	5.95 / 45.00
elongation factor 2	-	10,47	-	0,45	-	0,09	LinJ.36.0190	XP_001469588	5.65 / 50.00	5.79 / 94.26
eukaryotic translation initiation factor 3 subunit	0,08	22,1	-	0,08	-	0,42	LinJ.36.4070	XP_001469627	5.11 / 57.00	5.23 / 38.56
fructose-1,6-bisphosphate aldolase	0,45	-	5,51	0,48	0,32	-	LinJ.36.1320	XP_001469477	6.88/65.00	8.83 / 40.71
GDP-mannose pyrophosphorylase	-	-	2,76	-	-	0,13	LinJ.23.0120	XP_001465689	6.07/58.00	5.70 / 41.83
glucose-regulated protein 78	-	-	2,78	0,49	0,46	-	LinJ.28.1310	XP_001470161	5.13/46.00	5.19 / 68.90
glucose-regulated protein 78	0,43	0,46	6,48	2,82	0,28	-	LinJ.28.1310	XP_001470161	5.18/109.00	5.19 / 68.90
glycosomal phosphoenolpyruvate carboxykinase	-	-	277,74	0,48	0,001	-	LinJ.27.1710	XP_001466420	5.31/92.00	8.41/58.00
IgE-dependent histamine-releasing factor	11,64	-	-	-	-	-	LinJ.22.1310	XP_001465646	4.09 / 28.00	4.39 / 19.41
paraflagellar rod protein 1D	-	2,64	-	-	-	-	LinJ.29.1880	XP_003392693	5.60 / 97.00	5.36 / 68.97

pyruvate dehydrogenase E1 beta subunit	-	-	2,01	6,99	0,50	0,25	LinJ.25.1790	XP_001466210	5.43/46.00	5.64 / 37.84
pyruvate kinase	-	-	2,17	0,49	-	-	LinJ.35.5450	XP_001468820	6.81/92.00	6.48 / 55.19
S-adenosylhomocysteine hydrolase	0,30	4,54	8,66	0,48	0,17	-	LinJ.36.4100	XP_001469624	6.21/84.00 5.95 / 65.00	5.75 / 47.79
succinyl-CoA ligase [GDP-forming] beta-chain	5,15	-	5,51	0,48	0,32	-	LinJ.36.3100	XP_001469702	6.58/61.00	6.53 / 44.18
translation elongation factor 1-beta	11,32	0,09	5,77	21,94	0,31	0,35	LinJ.34.0890	XP_001468460	4.42 / 41.00 4.55/35.00	4.61 / 23.23
trypanothione reductase	0,21	6,32	-	24,23	-	0,31	LinJ.05.0350	XP_001462998	6.10 / 67.00	5.74 / 51.36
tryparedoxin	6,25	49,18	-	0,36	0,29	0,05	LinJ.29.1250	XP_001466642	5.04 / 13.00	5.20 / 16.69
tryparedoxin peroxidase	7,63	19,43	-	0,08	0,22	0,09	LinJ.15.1140	XP_001464446	6.35 / 28.00	7.56 / 22.01
UDP-glucose pyrophosphorylase	-	-	2,68	0,47	-	-	LinJ.18.0990	XP_001464913	5.78/91.00	5.56/54.36
vacuolar ATP synthase subunit b	0,19	6,79	-	24,23	-	-	LinJ.28.2610	XP_001470286	6.47/68.00 6.00 / 72.00	5.81 / 55.58

Apêndice 5: Quadro contendo as proteínas encontradas aumentadas referentes ao diagrama de Venn Triplo da Figura 30.

64 Proteínas aumentadas exclusivamente em Promastigota da cepa BH400	Identificador (NCBI)	32 Proteínas aumentadas em Ama. Axênica da cepa BH400	Identificador (NCBI)	48 Proteínas aumentadas em Ama. Esplênica da cepa BH400	Identificador (NCBI)
14-3-3 protein-like protein	XP_001469728.1	60S ribosomal protein L11 (L5, L16)	XP_003392484.1	alkyldihydroxyacetonephosphate synthase	XP_001466826.1
2,4-dihydroxyhept-2-ene-1,7-dioic acid aldolase	XP_001466240.1	chaperonin HSP60, mitochondrial precursor	XP_001469793.1	conserved hypothetical protein Lbrm.34.0220	CAM43239.1
40S ribosomal protein S12	XP_001464077.1	chaperonin HSP60, mitochondrial precursor	XP_001469794.1	conserved hypothetical protein LinJ.36.6170	XP_001464229.1
40S ribosomal protein S18	XP_001469510.1	conserved hypothetical protein LinJ.23.1980	XP_001462734.1	conserved hypothetical protein LinJ.36.4680	XP_001464332.1
40S ribosomal protein S2	XP_003392409.1	conserved hypothetical protein LinJ.36.1030	XP_001466355.1	conserved hypothetical protein LinJ.36.3370	XP_001466139.1
40S ribosomal protein S21	XP_001463878.1	conserved hypothetical protein LinJ.32.0660	XP_001466612.1	conserved hypothetical protein LinJ.35.4540	XP_001467994.1
40S ribosomal protein S27-1	XP_001469640.1	conserved hypothetical protein LinJ.29.0940	XP_001467738.1	conserved hypothetical protein LinJ.34.0960	XP_001468467.1
40S ribosomal protein S33	XP_001470507.1	conserved hypothetical protein LinJ.27.1100	XP_001469506.1	conserved hypothetical protein LinJ.32.3200	XP_001469256.1
40S ribosomal protein S5	XP_001463896.1	conserved hypothetical protein LinJ.26.1960	XP_001470535.1	conserved hypothetical protein LinJ.25.1100	XP_001469729.1
40S ribosomal protein S6	XP_001469018.1	conserved hypothetical protein LinJ.02.0430	XP_003392521.1	conserved hypothetical protein LinJ.14.0460	XP_001469844.1
60S ribosomal protein L13	XP_001466779.1	cyclophilin 2	XP_001463094.1	conserved hypothetical protein LinJ.14.1540	XP_001469973.1
60S ribosomal protein L18	XP_001464076.1	GP63, leishmanolysin	XP_001463699.2	conserved hypothetical protein LinJ.33.2570	XP_003392763.1
60S ribosomal protein L19	XP_001463122.1	GP63, leishmanolysin	XP_001463701.2	elongation factor-1 gamma	XP_001463559.1

60S ribosomal protein L23	XP_001469187.1	metallo-peptidase, Clan ME, Family M16	XP_001464106.1	h1 histone-like protein	XP_001468384.1
60S ribosomal protein L27A/L29	XP_001469186.1	metallo-peptidase, Clan ME, Family M16	XP_001465345.1	heat shock protein 70-related protein	XP_001470464.1
60S ribosomal protein L28	XP_001463910.1	metallo-peptidase, Clan ME, Family M16	XP_001468950.1	histone H2B	XP_001463598.1
60S ribosomal protein L32	XP_001469022.1	NADH-dependent fumarate reductase-like protein	XP_001468899.1	hypothetical protein LinJ.15.0730	XP_003392369.1
60S ribosomal protein L5	XP_001469007.1	polyprenol reductase	XP_001466216.1	hypothetical protein, unknown function	XP_003392442.1
conserved hypothetical protein Lbrm.35.3530	CAM44105.1	protein disulfide isomerase	XP_001463188.1	NPH2/RS6-like protein	XP_001464476.1
conserved hypothetical protein LinJ.08.1010	XP_001463434.1	40S ribosomal protein S11	XP_001465452.1	3,2-trans-enoyl-CoA isomerase, mitochondrial precursor	XP_001467527.1
conserved hypothetical protein LinJ.10.1420	XP_001463784.1	40S ribosomal protein S9	XP_001469478.1	40S ribosomal protein S16	XP_001470429.1
conserved hypothetical protein LinJ.14.0190	XP_001464202.1	60S ribosomal protein L10	XP_001462913.1	40S ribosomal protein S17	XP_001470300.1
conserved hypothetical protein LinJ.14.0240	XP_001464207.1	acetyl-CoA synthetase	XP_001465734.1	40S ribosomal protein S3	XP_001468174.1
conserved hypothetical protein LinJ.16.1500	XP_001464629.1	aldose 1-epimerase	XP_001468913.1	40S ribosomal protein S4	XP_001464142.1
conserved hypothetical protein LinJ.25.0160	XP_001466049.1	cyclophilin 4	XP_001468254.1	40S ribosomal protein S8	XP_001466007.1
conserved hypothetical protein LinJ.27.1220	XP_001466366.1	cytochrome c oxidase subunit V	XP_001470514.1	6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating	XP_001469143.1
conserved hypothetical protein LinJ.29.0170	XP_001466522.1	heat shock 70-related protein 1, mitochondrial precursor	XP_001467093.1	60S ribosomal protein L18a	XP_001468876.1
conserved hypothetical protein LinJ.30.3360	XP_001467184.1	mitochondrial phosphate transporter	XP_001469251.1	60S ribosomal protein L21	XP_001464535.1
conserved hypothetical protein LinJ.32.2330	XP_001467910.1	nucleolar protein	XP_001463670.1	60S ribosomal protein L23a	XP_003392220.1

conserved hypothetical protein LinJ.35.4450	XP_001469247.1	sterol 24-c-methyltransferase	XP_001469831.1	60S ribosomal protein L9	XP_003392474.1
conserved hypothetical protein LinJ.36.6110	XP_001469967.1	succinyl-CoA synthetase alpha subunit	XP_001466253.1	arginyl-tRNA synthetase	XP_001466367.1
conserved hypothetical protein LinJ.26.1080	XP_001470450.1	trypanothione reductase	XP_001462998.1	citrate synthase	XP_001464885.1
conserved hypothetical protein Tb11.01.8680	EAN80635.1			cystathione gamma lyase	XP_001469133.1
cyclophilin a	XP_001466123.1			eukaryotic initiation factor 5a	XP_001466105.1
dihydrolipoamide dehydrogenase	XP_001468025.1			glycosomal membrane protein	XP_001470269.1
elongation factor 1-beta	CBZ30222.1			glycosomal phosphoenolpyruvate carboxykinase	XP_001466420.1
elongation factor 2	XP_001469588.1			heat-shock protein hsp70	XP_001470324.1
endoribonuclease L-PSP (pb5)	XP_001465699.1			map kinase	XP_001468229.1
eukaryotic initiation factor 4a	XP_001462693.1			pyruvate dehydrogenase E1 component alpha subunit	XP_001464949.1
eukaryotic translation initiation factor 3 subunit	XP_001469627.1			seryl-tRNA synthetase	XP_001463813.1
eukaryotic translation initiation factor 6 (eIF-6)	XP_001469514.1			small GTP-binding protein Rab11	XP_001463744.1
glutamine synthetase	XP_001463119.1			U3 snoRNA-associated protein UTP11	XP_001682644.1
IgE-dependent histamine-releasing factor	XP_001465979.1			ubiquitin/ribosomal protein S27a	XP_001469543.1
Ia RNA binding protein	XP_001465365.1			RNA-binding protein, UPB1	XP_003392595.1
microtubule-associated protein	XP_001463001.1			thiol-dependent reductase 1	XP_001468111.1
NADH-cytochrome b5 reductase	XP_001464125.1			ubiquitin-fusion protein	XP_003392716.1
NADP-dependent alcohol dehydrogenase	XP_001465717.1			d-isomer specific 2-hydroxyacid dehydrogenase-protein	XP_001468522.2
nucleosome assembly protein-like protein	XP_001467471.1			polyubiquitin	XP_001463552.2

P-type H ⁺ -ATPase	XP_001464964.2				
phosphomannomutase	XP_001469787.1				
prostaglandin f2-alpha synthase/D-arabinose dehydrogenase	XP_001467513.1				
proteasome alpha 1 subunit	XP_001469290.1				
proteasome alpha 3 subunit	XP_001464214.1				
proteasome regulatory non-ATP-ase subunit	XP_001467806.1				
reiske iron-sulfur protein precursor	XP_001468974.2				
reticulon domain protein, 22 kDa potentially aggravating protein (pale22)	XP_001467102.1				
ribosomal protein L27	XP_001467959.1				
ribosomal protein L3	XP_001468006.1				
ribosomal protein S7	XP_001462656.1				
RNA binding protein	XP_001467761.1				
RNA-binding protein	XP_001462957.1				
soluble promastigote surface antigen PSA-38S	ACY70940.1				
spermidine synthase	XP_001462895.1				
Surface membrane glycoprotein GP46/M-2	P21978.1				

Apêndice 6: Quadro contendo as proteínas encontradas aumentadas referentes ao diagrama de Venn Triplo da Figura 31.

48 Proteínas diminuídas exclusivamente em Promastigota da cepa BH400	Identificador (NCBI)	45 Proteínas diminuídas exclusivamente em Ama. Axênica da cepa BH400	Identificador (NCBI)	26 Proteínas diminuídas exclusivamente em Ama. Esplênica da cepa BH400	Identificador (NCBI)
2,3-bisphosphoglycerate-independent phosphoglycerate mutase	XP_003392848.1	2-oxoisovalerate dehydrogenase alpha subunit	XP_001465431.1	20S proteasome subunit alpha 5, (putative)	XP_001465480.1
3-ketoacyl-CoA thiolase-like protein	XP_003860986.1	2,4-dihydroxyhept-2-ene-1,7-dioic acid aldolase	XP_001466240.1	40S ribosomal protein S12	XP_001464077.1
3,2-trans-enoyl-CoA isomerase, mitochondrial precursor	XP_001467527.1	40S ribosomal protein S15	XP_001465565.1	60S ribosomal protein L11 (L5, L16)	XP_003392484.1
40S ribosomal protein S23	XP_003392475.1	40S ribosomal protein S17	XP_001470300.1	aconitase	XP_001464867.1
60S ribosomal protein L13a	XP_001468462.1	60S ribosomal protein L23	XP_001469187.1	calreticulin	XP_001467584.1
60S ribosomal protein L34	XP_001464951.1	60S ribosomal protein L37	XP_003392739.1	cathepsin L-like protease	XP_003392238.1
adenosine kinase	XP_001466939.1	60S ribosomal protein L5	XP_001469007.1	conserved hypothetical protein LinJ.10.1420	XP_001463784.1
ATP-dependent DEAD/H RNA helicase	XP_001463224.1	ADP-ribosylation factor	XP_001467603.1	conserved hypothetical protein LinJ.26.1080	XP_001470450.1
ATP-dependent phosphofructokinase	XP_001466784.1	calpain-like cysteine peptidase, Clan CA, family C2	XP_001465262.1	conserved hypothetical protein LinJ.26.1960	XP_001470535.1
ATP-dependent RNA helicase	XP_001469120.1	chaperonin containing t-complex protein	XP_001467786.1	conserved hypothetical protein LinJ.27.1100	XP_001466355.1
ATPase alpha subunit	XP_001463013.2	conserved hypothetical protein Lbrm.35.3530	CAM44105.1	conserved hypothetical protein LinJ.28.1830	XP_001470210.1
calpain-like cysteine peptidase	XP_001465252.2	conserved hypothetical protein LinJ.11.0820	XP_001463882.1	conserved hypothetical protein LinJ.30.3360	XP_001467184.1
citrate synthase	XP_001464885.1	conserved hypothetical protein LinJ.15.1170	XP_003392371.1	conserved hypothetical protein LinJ.32.0660	XP_001467738.1
conserved hypothetical protein LinJ.18.0210	XP_001464838.1	conserved hypothetical protein LinJ.23.0090	XP_001465686.1	conserved hypothetical protein LinJ.36.1030	XP_001469506.1
conserved hypothetical protein LinJ.18.1640	XP_001464976.1	conserved hypothetical protein LinJ.26.2580	XP_001470588.1	conserved hypothetical protein Tb11.01.8680	EAN80635.1

conserved hypothetical protein LinJ.24.2200	XP_001466011.1	conserved hypothetical protein LinJ.32.3040	XP_001467979.1	elongation factor 1-beta	CBZ30222.1
conserved hypothetical protein LinJ.29.0940	XP_001466612.1	conserved hypothetical protein LinJ.32.3410	XP_001468015.1	elongation factor 2	XP_001469588.1
conserved hypothetical protein LinJ.32.3000	XP_001467976.1	conserved hypothetical protein LinJ.36.3370	XP_001469729.1	eukaryotic translation initiation factor 3 subunit 7-like protein	XP_001467154.1
conserved hypothetical protein Lbrm.29.2740	CAM40130.1	conserved hypothetical protein Lmjf.34.1360	CAJ07846.1	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, glycosomal	XP_001467146.1
conserved hypothetical protein LinJ.02.0430	XP_001462734.1	d-isomer specific 2-hydroxyacid dehydrogenase-protein	XP_001468522.2	metallo-peptidase, Clan ME, Family M16	XP_001468950.1
conserved hypothetical protein LinJ.06.0030	XP_001463087.1	dihydrolipoamide acetyltransferase precursor	XP_001469441.1	mitochondrial phosphate transporter	XP_001469251.1
conserved hypothetical protein Lmxm.17.0990	CBZ25458.1	endoribonuclease L-PSP (pb5)	XP_001465699.1	phosphomannomutase	XP_001469787.1
cyclophilin 2	XP_001463094.1	fructose-1,6-bisphosphate aldolase	XP_001469477.1	proteasome alpha 2 subunit	XP_001465467.1
cystathione gamma lyase	XP_001469133.1	glucose-6-phosphate isomerase	XP_003392293.1	proteasome alpha 3 subunit	XP_001464214.1
cysteine peptidase, Clan CA, family C2	XP_001467313.1	heat shock protein	XP_003392406.1	small GTP-binding protein Rab1	XP_003392649.1
d-isomer specific 2-hydroxyacid dehydrogenase-like protein	XP_001468792.1	heat shock protein DNAJ	XP_001466474.1	trypanothione reductase	XP_001462998.1
elongation factor 1-alpha	XP_001464664.1	histone H1	XP_001466353.1		
glycosomal membrane protein	XP_001470269.1	histone H2B	XP_001463598.1		
GP63, leishmanolysin	XP_001463699.2	hypothetical protein LINJ_15_0730	XP_003392369.1		
GP63, leishmanolysin	XP_001463701.2	hypothetical protein SCD6.10	XP_001466086.1		
heat shock 70-related protein 1, mitochondrial precursor	XP_001467093.1	map kinase	XP_001468229.1		
histone H3 variant	XP_001465025.1	metallo-peptidase, Clan M-, Family M49	XP_001463059.1		
hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase	XP_003392447.1	N-acyl-L-amino acid amidohydrolase	XP_001467406.1		
metallo-peptidase, Clan ME, Family M16	XP_001464106.1	protein transport protein Sec13	XP_001467687.1		

mitochondrial RNA binding protein 2, MRP2, gBP25	XP_001463575.1	rab1 small GTP-binding protein	XP_001463769.1		
ribosomal protein S6,NPH2/RS6-like protein	XP_001464476.1	ras-related rab-4	XP_001467752.1		
orotidine-5-phosphate decarboxylase/orotate phosphoribosyltransferase	XP_001464543.1	reiske iron-sulfur protein precursor	XP_001468974.2		
oxidoreductase	XP_001470025.1	ribosomal protein S25	XP_001466153.1		
protein disulfide isomerase	XP_001463188.1	seryl-tRNA synthetase	XP_001463813.1		
protein kinase	XP_001466789.1	spermidine synthase	XP_001462895.1		
pyruvate dehydrogenase E1 beta subunit	XP_001466210.1	splicing factor ptrs1-like protein	XP_001463304.1		
ribonucleoprotein p18, mitochondrial precursor	XP_001464371.1	stress-induced protein sti1	XP_001463435.1		
ribosomal protein L24	XP_001469493.2	T-complex protein 1, beta subunit	XP_001466359.1		
RNA helicase	XP_001465449.1	T-complex protein 1, theta subunit	XP_001469401.1		
sterol 24-c-methyltransferase	XP_001469831.1	UDP-glucose pyrophosphorylase	XP_001464913.1		
translation elongation factor 1-beta	XP_001468460.1				
U3 small nucleolar ribonucleoprotein protein MPP10	XP_001466597.1				
vacuolar-type proton translocating pyrophosphatase 1	XP_001467417.1				
P-type H ⁺ -ATPase	XP_001464964.2				
phosphomannomutase	XP_001469787.1				
prostaglandin f2-alpha synthase/D-arabinose dehydrogenase	XP_001467513.1				
proteasome alpha 1 subunit	XP_001469290.1				
proteasome alpha 3 subunit	XP_001464214.1				
proteasome regulatory non-ATP-ase subunit	XP_001467806.1				

reiske iron-sulfur protein precursor	XP_001468974.2				
reticulon domain protein, 22 kDa potentially aggravating protein (paple22)	XP_001467102.1				
ribosomal protein L27	XP_001467959.1				
ribosomal protein L3	XP_001468006.1				
ribosomal protein S7	XP_001462656.1				
RNA binding protein	XP_001467761.1				
RNA-binding protein	XP_001462957.1				
soluble promastigote surface antigen PSA-38S	ACY70940.1				
spermidine synthase	XP_001462895.1				
Surface membrane glycoprotein GP46/M-2	P21978.1				